MOLEKULARER MECHANISMUS DER BLAULICHTABHÄNGIGEN SAUERSTOFFAUFNAHME BEI EINER GELBEN UND EINER WEISSEN CHLORELLA-MUTANTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
WOLF-DIETRICH KRAUSS
aus Stuttgart

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0061

MOLEKULARER MECHANISMUS DER BLAULICHTABHÄNGIGEN SAUERSTOFFAUFNAHME BEI EINER GELBEN UND EINER WEISSEN CHLORELLA-MUTANTE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Wolf-Dietrich Krauß
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	26.5.1983
Dekan	Prof. Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager
2. Berichterstatter	Prof. Dr. B. Schwemmle

Beim Abschluß dieser Arbeit möchte ich besonders danken

- Herrn Prof. Dr. A. Hager für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und großzügige Unterstützung;

- Herrn Dr. H. Stransky für die Beratung in technischen Fragen;

- Herrn B. Metzler für die Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen;

- Herrn W. Biber für die Präparation der Maisvesikel;

- allen Mitarbeitern des Lehrbereichs Allgemeine Botanik, die durch Diskussion und anregende Ideen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Chemikalien	4
2.2. Versuchsobjekte und Kulturbedingungen	5
2.3. Transmissions-Elektronenmikroskopie	6
2.4. Versuchsanlage und -durchführung	7
2.4.1. Bestrahlungsanlage	7
2.4.2. Messung der Sauerstoffaufnahme	8
2.5. Messung der CO_2-Abgabe	9
2.6. ATP-Bestimmung	9
2.7. Pigmentidentifizierung	10
2.7.1. Pigmentextraktion	10
2.7.2. Absorptionsspektren	10
2.7.3. Fluoreszenzspektren	10
2.7.4. Dünnschichtchromatographie	11
2.8. Bestimmung der Lipidperoxidation	11
2.9. Extraktion der freien Aminosäuren	12
2.10. Cysteinoxidation	16
2.11. Protonenpumpen bei mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile	17
3. Ergebnisse	18
3.1. Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der Chlorella-Mutanten	18
3.2. Reaktionen der Mutanten auf Licht	19
3.2.1. Sauerstoffaufnahme	19
3.2.2. ATP-Gehalt	20
3.2.3. Atmung	22
3.3. Identifizierung des Photorezeptors	23
3.3.1. Wirkungsspektren	23
3.3.2. Absorptionsspektren von 80 % Acetonextrakten	25
3.3.3. Fluoreszenzspektren von 80 % Acetonextrakten	27
3.3.4. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmentextrakte	28
3.3.5. Porphyrinidentifizierung	30

Seite

3.4. Nachweis von Singulett-Sauerstoff in den belichteten Chlorella-Zellen 31
3.4.1. Porphyrine als Photosensibilisatoren 31
3.4.2. Einfluß von exogen angebotenem Protoporphyrin IX 32
3.4.3. Einfluß von Quenchern 35
3.4.2.1. NaN_3 und α-Tocopherol 35
3.4.2.2. Imidazol 36
3.4.4. Ausschluß von Hydroxyl-Radikalen 37
3.4.5. Ausschluß von Superoxidradikalen 38

3.5. Oxidation von Zellbestandteilen 38
3.5.1. Membran-Lipide 38
3.5.1.1. Einfluß von Quenchern und N_2 40
3.5.2. Freie Aminosäuren 41
3.5.2.1. Einfluß von Quenchern 42

3.6. Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf Cystein 44

3.7. Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf die ATP-getriebenen Protonenpumpen bei mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile 46

4. Diskussion 47

5. Zusammenfassung 55

6. Literaturverzeichnis 57

7. Abkürzungen 64

1. Einleitung

Licht hat für die Pflanzen in zweifacher Hinsicht Bedeutung: Zum einen wird es in den Chloroplasten im Zuge der Photosynthese-Reaktion in chemische Energie umgewandelt; zum anderen ist Licht für verschiedene Vorgänge eine Art Signalgeber. So spielt ein hellrotes und ein dunkelrotes Wellenband bei verschiedenen Differenzierungsschritten und morphogenetischen Vorgängen eine Rolle (Smith, 1975). Der Lichtakzeptor für dieses hell- und dunkelrote Licht ist das sogenannte Phytochromsystem; dieses ist wahrscheinlich auch bei den Lichtmeßvorgängen beteiligt, welche für die Auslösung der photoperiodischen Blühinduktion von Wichtigkeit sind.

Daneben spielt als Signalgeber blaues Licht eine wichtige Rolle vor allem bei Bewegungsvorgängen und bei der Auslösung von Stoffwechselreaktionen. Bei den Bewegungen sind besonders die phototropen Krümmungsreaktionen zu nennen, die sowohl bei Pilzen (Lipson, 1980) als auch bei Algen und höheren Pflanzen (Briggs und Blatt, 1980) eingehend untersucht wurden. So wird die phototrope Krümmung bei Koleoptilen über eine blaulichtinduzierte Hemmung der Auxinwirkung auf der belichteten Flanke erklärt (Franssen et al., 1981). Nach Hager und Schmidt (1968a; 1968b) wird bei Blaulichtbestrahlung auxinhaltiger Koleoptilen vor allem auf der Lichtflanke das Photooxidationsprodukt 3-Methylenoxindol gebildet, das die Auxin-Carrier blockieren soll und dadurch den weiteren Transport von Auxin vermindert. Daraus resultiert eine Ablenkung des Wuchsstoffstromes zur Schattenflanke hin und damit eine Krümmungsreaktion (Hager, 1971).

Besonders gut untersuchte Blaulichtwirkungen auf den Stoffwechsel sind die Induktion der Carotinoidbiosynthese (Rau, 1980a; 1980b), die Wirkungen auf die Chloroplastenentwicklung, auf den Kohlenhydratstoffwechsel und die Atmung, ferner die Wirkungen auf den Stickstoffmetabolismus (vgl. dazu Senger, 1980). Weitere Blaulichtwirkungen sind in Übersichtsartikeln von Senger (1982), Gressel (1979) und von Presti und Delbrück (1978) beschrieben.

Mit der Aufdeckung dieser blaulichtabhängigen Prozesse war gleichzeitig die Suche nach dem dafür verantwortlichen Pigment (Photorezeptor) verbunden. Das für die Vorgänge verantwortliche Pigment (oder Pigmentsystem) wurde als Cryptochrom bezeichnet, da man sich wegen der chemischen Natur des Rezeptors nicht festlegen wollte oder auch konnte. Das Aktionsspektrum ähnelt in vielen Fällen dem Absorptionsspektrum von Flavinen, aber auch dem von Carotinoiden. So wurden zunächst diese Pigmente als Blaulicht-Photorezeptoren vorgeschlagen. Daneben werden für die "Blaulicht"-Wirkungen auch noch andere Pigmente in Erwägung gezogen. Hier sind vor allem bestimmte Porphyrine anzuführen, die von verschiedenen Autoren als Photorezeptoren angesprochen werden (Howes und Batra, 1970; Burchard und Hendricks, 1969).

Ein besonders auffälliger Blaulichteffekt ist die Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei bestimmten Organismen. Bereits Emerson und Lewis (1943) beschreiben diesen Effekt bei Chlorella pyrenoidosa. In den folgenden Jahren wurden dazu Versuche an Chlorella und Scenedesmus durchgeführt (vgl. dazu Kowallik, 1982). In diesen Arbeiten wird die gesteigerte Sauerstoffaufnahme immer auf eine Steigerung der mitochondrialen Atmung zurückgeführt. Zu einem anderen Ergebnis kommen Kandler und Schötz (1956), die den erhöhten Sauerstoffverbrauch bei Blaulichtbestrahlung auf eine photooxidative Pigmentzerstörung zurückführen.

Die Frage des für die Atmungssteigerung verantwortlichen Photorezeptors konnte zunächst nicht geklärt werden. Die Wirkungsspektren sprachen sowohl für Carotinoide als auch für Flavine. Es kamen dann jedoch Zweifel an den Carotinoiden als die verantwortlichen Photorezeptoren auf, als carotinoidfreie Pigmentmutanten (Kowallik, 1966; 1967; 1982) noch einen ähnlichen Blaulichteffekt zeigten.

Über die Primärprozesse der Lichtabsorption, über die Natur der Signalkette und die danach in Gang gesetzten biochemischen Reaktionen gibt es noch wenig gesicherte Vorstellungen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die blaulichtabhängige Sauerstoffaufnahme bei Pigment-Mutanten von Chlorella vulgaris eingehend zu charakterisieren. Im Vordergrund stand dabei die Klärung, ob die blaulichtabhängige Steigerung der Sauerstoffaufnahme auf eine Atmungssteigerung zurückgeführt werden kann oder ob andere Reaktionen ablaufen. Eine Identifizierung des verantwortlichen Photorezeptors sollte helfen, die bei der Primärreaktion ablaufenden biochemischen Vorgänge zu klären. Letztlich ging es auch darum, Möglichkeiten aufzuzeigen, wie die Primärreaktion bei Blaulichteffekten ablaufen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

GSH (Glutathion, reduziert)	Boehringer, Mannheim
Superoxiddismutase (E.C. 1.15.1.1.)	
Hefe-Extrakt	Difco Laboratories,
Bacto-Tryptone	Detroit, USA
Imidazol	EGA-Chemie, Steinheim
L-Cysteinsäure Monohydrat	Fluka, Neu-Ulm
ERL-Komponenten	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd	
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure)	
DTT (1,4.Dithiothreit)	Sigma, München
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-amino-ethylether)-N,N-tetraessigsäure)	
Protoporphyrin IX dimethylester	
Protoporphyrin IX-Na_2-Salz	
SHAM (Salicylhydroxaminsäure)	
Tris (Tris(hydroxymethyl)amino-methan)	

Für die Versuche wurden mit Ausnahme der hier aufgeführten Substanzen ausschließlich analysenreine Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt verwendet.

2.2. Versuchsobjekte und Kulturbedingungen

Als Versuchsobjekte standen zur Verfügung:

- eine chlorophyll- und carotinoidfreie Mutante von Chlorella vulgaris (Stamm 125 a) aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen. Im folgenden wird sie abkürzend als "weiße Mutante" bezeichnet.
- eine chlorophyllfreie, aber carotinoidhaltige Mutante von Chlorella vulgaris (Stamm 211-11h/20, Algensammlung Göttingen). Sie wird im folgenden als "gelbe Mutante" bezeichnet.

Kulturbedingungen
Die Kulturen wurden auf Nähragar unter sterilen Bedingungen in Petrischalen im Klimaschrank bei 20° C herangezogen.

Nähragar (100 ml):	Glucose (0,2 %)	2 ml
	Hefe-Extrakt (0,1 %)	1 ml
	Bacto-Tryptone (0,1 %)	10 ml
	Agar-Agar	1,2 g
	H_2O bidest.	87 ml

Zu Versuchszwecken erfolgte die Anzucht beider Mutanten unter sterilen Bedingungen in einer Nährlösung nach Ruppel (1962) mit 1,5 % Glucose als Kohlenstoffquelle (Tab. 1). Die Anzucht erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben im Inkubationsschüttler (Clim-O-Shake, Fa. Kühner, Basel) bei 90 Upm, 25° C und in Dunkelheit. In den einzelnen Versuchen kamen Algen aus der stationären Wachstumsphase (Alter 4-6 Wochen) zum Einsatz.

Grundlösung (Mineralsalze in Aqua bidest.)	g/l
KNO_3	0,809
$NaNO_3$	0,680
$NaH_2PO_4 \times 1\ H_2O$	0,468
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	0,178
$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	0,024
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,247
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,001
Spurenlösung in 0,02 N H_2SO_4	**g/l**
H_3BO_3	0,300
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,200
$(NH_4)_2Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,002
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,008
Eisenlösung in Aqua bidest. (heiß)	**g/100 ml**
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	1,390
EDTA	1,860

Tab. 1. Zusammensetzung der Nährlösung nach Ruppel (1962), pH 6,8.

Zu 1000 ml Grundlösung werden 8 ml der Spurenlösung pipettiert und autoklaviert. Danach wird 1 ml bereits sterilisierter Eisenlösung zupipettiert.

2.3. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Dazu wurden die Algen bei 500 x g aus der Nährlösung abzentrifugiert, mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und in Difco-Agar (Endkonzentration 1,5 %) eingebettet.

Diese Proben wurden in Anlehnung an Ruthmann (1966) behandelt: Vorfixierung bei 4° C in Glutaraldehydlösung (3 %) mit Phosphatpuffer pH 7,2, Magnesiumsulfat (0,1 mM) und Saccharose (66 mM); Fixierung in gepufferter Osmiumtetroxidlösung (1,1 %) über zwei Stunden bei Raumtemperatur; eine Stunde Kontrastierung

in Uranylacetat (1 %); Entwässerung durch Ethanolreihe und Einbettung in ERL nach Spurr (1969). Dünnschnitte wurden an einem Reichert Ultramikrotom OM U3 angefertigt, mit Glas- bzw. Diamantmesser. Die Nachkontrastierung erfolgte mit Bleicitrat nach Reynolds (1963) über 2 - 5 min. Die Untersuchung wurde mit einem Zeiss EM 9 S2 durchgeführt.

2.4. Versuchsanlage und -durchführung

2.4.1. Bestrahlungsanlage

Die Versuchsanlage (Abb. 1) befand sich in einem Konstantraum (25°C, grünes Sicherheitslicht).

Bestrahlungsanlage

- für Weißlicht: Liesegang-Projektor A 30.
  36,8 mW x cm^{-2}.
- für monochromatisches Licht: Xenon-Bogenlampe (Osram XBO 450 W/2 ofr im Lampengehäuse LHC 151/2).
  High Intensity Grating Monochromator GM 250 (Schoeffel Instrument, Trappenkamp). Eingangsspaltbreite 3,00 mm; Ausgangsspaltbreite 4,50 mm. Durch Abstandsvariation wurde eine Belichtungsenergie von 3,5 mW x cm^{-2} eingestellt.

Die Bestimmung der Lichtintensitäten erfolgte mit einem calibrierten Meßgerät (SL Research Radiometer, Detektor 857, Filter F 242, International Light Inc.).

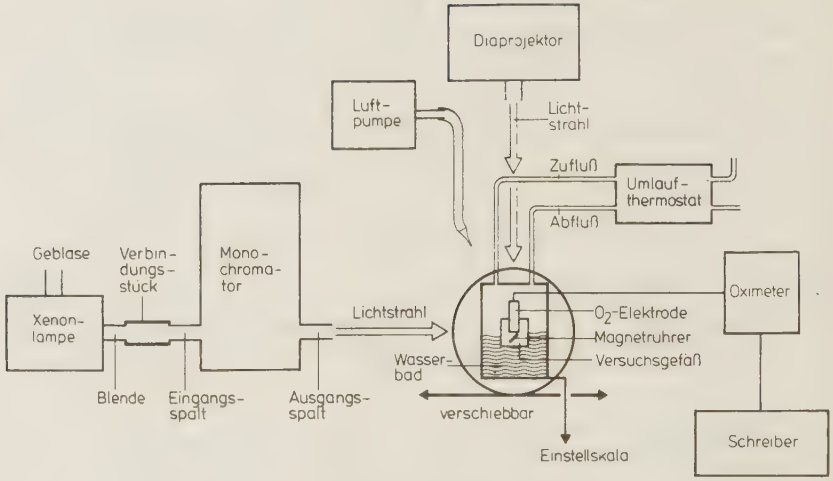

Abb. 1. Versuchsanlage

2.4.2. Messung der Sauerstoffaufnahme

Die Messung der Sauerstoffaufnahme wurde mit dem Biological Oxygen Monitor (Model 53, Yellow Springs Instrument Co.; Schreiber W + W Recorder, Modell 314) im Wasserbad bei 25° C (Lauda-Thermostat, Typ K2-D) durchgeführt. Dazu wurden die Algen 5 min bei 500 x g von der Nährlösung abzentrifugiert, einmal mit 100 ml 50 mM Puffer pH 7,2 (Na_2HPO_4/KH_2PO_4) gewaschen, in Phosphatpuffer resuspendiert und auf eine Zellzahl von 10^8 Zellen x ml^{-1} eingestellt. Zu den Messungen wurden 8 ml Algensuspension abpipettiert und im Wasserbad 5 min mit Luft durchspült, um zu Versuchsbeginn reproduzierbare Sauerstoffgehalte zu gewährleisten. Die Sauerstoffaufnahme wurde 5 min im Dunkeln gemessen, und dann Weißlicht oder monochromatisches Licht eingestrahlt. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte mit einer Hamilton-Spritze. CN^- und SHAM wurden 10 min vor Versuchsbeginn zugegeben. Zur Kontrolle wurde immer die Wirkung dieser Substanzen auf die Atmungs-

rate im Dunkeln gemessen. Nach jeder Messung wurde die Algenprobe durch eine neue ersetzt.

Mit dem Glasperlenhomogenisator wurden die Mutanten für die Versuche im zellfreien System aufgebrochen. Dazu wurden die Algen zunächst 5 min bei 500 x g von der Nährlösung abzentrifugiert, mit 100 ml Puffer pH 7,2 (Na_2HPO_4/KH_2PO_4) gewaschen, auf 10^8 Zellen x ml^{-1} eingestellt und zusammen mit Glasperlen (Ø 0,5 mm und 0,1 mm) in ein Glasgefäß eines Glasperlenhomogenisators (Zellhomogenisator Modell MSK, Fa. Braun, Melsungen) gegeben und 2 min unter CO_2-Kühlung homogenisiert. Der Überstand wurde dekantiert und 5 min bei 1500 x g zentrifugiert.

2.5. Messung der CO_2-Abgabe

Die Messung der CO_2-Abgabe erfolgte im offenen System mit dem Infrarotmeßgerät (Fa. Beckmann, Modell 864). 20 ml Algenprobe wurden kontinuierlich (40 ml x min^{-1}) mit CO_2-freier Luft im Wasserbad bei 30°C durchspült. Die Messung erfolgte im Dunkeln und im Weißlicht (36,8 mW x cm^{-2}).

2.6. ATP-Bestimmung

Nach Bestimmung der Sauerstoffaufnahme im Dunkeln bzw. Licht wurden den Proben (8×10^8 Algenzellen) 4 ml Perchlorsäure (Endkonzentration 6 %) zugegeben, geschüttelt und 30 min im Eisbad extrahiert. Diese Proben wurden anschließend mit Puffer (2 M KOH, 1 M KCl, 0,2 M Hepes) neutralisiert (pH 7,4) und 10 min bei 30 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit H_2O bidest. auf 20 ml aufgefüllt und anschließend für die ATP-Bestimmung nach der Luciferin-Luciferase-Methode verwendet. Diese Bestimmungen erfolgten mit dem Luminometer 1250 (LKB, Wallac).

2.7. Pigmentidentifizierung

2.7.1. Pigmentextraktion

Die Pigmentextraktion erfolgte in Anlehnung an die von Hager und Meyer-Bertenrath (1966) beschriebene Methode. Ein Aliquot der zu untersuchenden Algen wurde 5 min bei 3 000 x g zentrifugiert, das Sediment mit 50 mM Puffer pH 7,2 (Na_2HPO_4/KH_2PO_4) gewaschen und in 40 ml eiskaltes 80 % Aceton aufgenommen. Diese Lösung wurde zusammen mit Glasperlen (Ø 0,5 mm und 0,1 mm) in ein Glasgefäß eines Glasperlenhomogenisators gegeben und unter CO_2-Kühlung 4 min homogenisiert. Der Extrakt wurde anschließend mittels einer Glasfilternutsche (G4, Ø 5 cm) von Festbestandteilen gereinigt. Eventuell zurückbleibende Pigmentreste wurden mit 80 % Aceton ausgespült.

2.7.2. Absorptionsspektren

Mit dem Shimadzu Double-Beam/Difference/Dual Wavelength Recording Spectrophotometer (Modell UV 300) wurden von den Pigmentextrakten Absorptionsspektren im Bereich von 300 nm bis 700 nm aufgenommen.

2.7.3. Fluoreszenzspektren

Mit dem Spektralfluorimeter Farrand (Typ MK 1) wurde das Fluoreszenzverhalten der Pigmentextrakte der gelben und weißen Mutante untersucht.

Die Messungen erfolgten mit Anregungskorrektur und im Doppel-Strahl-Differenz-Verfahren, wodurch Störungen durch fluoreszierende Substanzen im Extrakt durch die verwendeten Lösungsmittel eliminiert wurden. Es wurden Emissionsspektren (Anregung 400 nm) im Bereich von 410 nm - 700 nm und Anregungsspektren (Fluoreszenzemission 632 nm) im Bereich von 240 nm - 700 nm gemessen.

2.7.4. Dünnschichtchromatographie

Die in 80 % Aceton gelösten Porphyrine wurden in Anlehnung an Falk (1964) in Diethylether überführt. Dazu wurden die Pigmentextrakte mit 0,1 N HCl auf einen pH-Wert unter 4 eingestellt und in einem Scheidetrichter mit dem doppelten Volumen an Diethylether überschichtet und 3 min sehr stark geschüttelt. Die obere Phase enthielt die Porphyrine und wurde im Rotationsverdampfer auf ein gewünschtes Volumen eingeengt.

Zur Auftrennung der 80 % Aceton-Pigmentextrakte wurden DC-Fertigplatten (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,2 mm, Fa. Merck) verwendet.

Laufmittel:
Aceton-Wasser-Petrolether, 34:4:3

Lokalisierung der Pigmente:
- Fluoreszenzlöschung im UV-Licht (254 nm)
- bräunlich-rote Fluoreszenz der Porphyrine bei Anregung mit 366 nm.

2.8. Bestimmung der Lipidperoxidation

Die Algen wurden 5 min bei 500 x g von der Nährlösung abzentrifugiert, einmal mit 100 ml Puffer pH 7,2 (Na_2HPO_4/KH_2PO_4) gewaschen und in Puffer (175 mM NaCl, 50 mM Tris, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt) aufgenommen und auf eine Zellzahl von 10^8 Zellen x ml^{-1} eingestellt. Die Belichtung mit 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht erfolgte in Reagenzgläsern im Wasserbad bei 25° C. Um die Sauerstoffkonzentration konstant zu halten und um ein Absitzen der Algen zu verhindern, wurden die Proben leicht mit Luft durchspült. Die Zugabe der Quencher DABCO (25 mM) oder Natriumazid (5 mM) erfolgte 10 min vor Belichtungsbeginn. Durch Einleiten von N_2 wurden bestimmte Proben sauerstofffrei gehalten.

Die Lipidperoxidation wurde durch Bestimmung von Malondialdehyd, einem Abbauprodukt ungesättigter Fettsäuren, in Anlehnung an die von Heath und Packer (1968) beschriebene Me-

thode durchgeführt. Zu 8 ml Algenprobe wurden 18 ml 0,5 % TBA in 20 % TCA gegeben, 25 min bei 95°C im Wasserbad gehalten, auf Eis abgekühlt und dann 10 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Die Absorption des entstandenen Farbkomplexes im Überstand wurde bei 532 nm mit dem 8450 UV/VIS Spectrophotometer (Fa. Hewlett Packard) bestimmt und korrigiert durch Subtraktion der Absorption bei 600 nm für unspezifische Trübung. Zur quantitativen Bestimmung von Malondialdehyd wurde der Extinktionskoeffizient von 155 $mM^{-1} \times cm^{-1}$ (Heath and Packer, 1968) benützt.

2.9. Extraktion der freien Aminosäuren

Vor Bestimmung der Konzentration der freien Aminosäuren wurden die Algen aus dem Vorratsgefäß entnommen und im Wasserbad bei 25°C in Reagenzgläsern mit Weißlicht von 36,8 $mW \times cm^{-2}$ bestrahlt. Um einen konstanten Sauerstoffgehalt zu gewährleisten, wurde jede Algenprobe (8×10^8 Zellen) leicht mit Luft durchspült.

Extraktion

Dazu wurden 6 ml Algenprobe in 24 ml Methanol kurz aufgekocht, 30 min im Kühlschrank aufbewahrt, um Proteine zu fällen, und anschließend 10 min bei 48 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde dann mit 30 ml 50 % Methanol und anschließend nochmals mit 30 ml 30 % Methanol gewaschen, um eine quantitative Extraktion zu erreichen. Die drei vereinigten Überstände wurden bei 60°C im Rotationsverdampfer getrocknet und in 2 ml Probenverdünnungspuffer aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Membranfilter mit 0,45 µm Porenweite (Fa. Sartorius, Typ SM 11 306) abgetrennt. Damit waren die Proben für die Bestimmung im Aminosäureanalysator zubereitet. Eine eventuelle Lagerung der Proben (maximal 48 Stunden) erfolgte bei - 20°C.

Auftrennung, Identifikation und quantitative Bestimmung der freien Aminosäuren

Die Auftrennung, Identifikation und quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mittels Ionenaustausch-

Flüssigkeitschromatographie und Detektion mit Ninhydrin. Verwendet wurde das Gerät Amino Acid Analyzer LC 6001 (Biotronic GmbH, Frankfurt).

Harzbett	4 x 145 mm
Harz	BTC 4M
Vorwaschsäule	6 x 30 mm
Harz	BTC F
Pufferdurchflußrate	22 ml x h^{-1}
Ninhydrindurchflußrate	19 ml x h^{-1}
Temperatur T_1	39,6°C
Temperatur T_2	55,3°C

Tab. 2. Gerätedaten für das "Trennprogramm physiologische Flüssigkeiten".

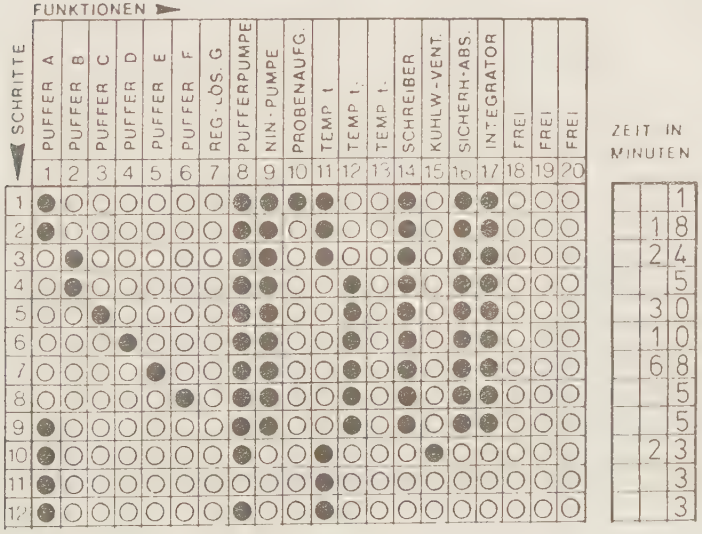

Abb. 2. Programmeinstellung "Trennprogramm physiologische Flüssigkeiten".

Für die Analyse der Proben wurden folgende Puffer und Reagenzien verwendet.

Puffer	A	B	C	D	E
LiOH x H_2O	10,08 g	10,08 g	16,78 g	16,78 g	16,78 g
Citronensäure x H_2O	25,22 g	25,22 g	25,22 g	25,22 g	25,22 g
LiCl	-	-	-	8,48 g	84,78 g
HCl 37 %	nach Bedarf zur pH-Einstellung				
Methanol	140 ml	100 ml	-	-	-
Brij 30 %	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Phenol 80 %	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Endvolumen	2,00 l	2,00 l	2,00 l	2,00 l	2,00 l
pH	2,35	3,22	3,30	4,05	3,40
Li^+-Konzentr.	0,12 M	0,12 M	0,20 M	0,30 M	1,20 M
Citrat-Konz.	0,06 M	0,06 M	0,06 M	0,06 M	0,06 M

Tab. 3. Puffer zur Elution der Aminosäuren.

LiOH	6,30 g/l
Citronensäure-1-hydrat	21,01 g/l
HCl 37 %	nach Bedarf zur pH-Einst.
Phenol 80 %	1,00 ml/l
Thiodiethanol	20,00 ml/l
pH	2,2

Tab. 4. Probenverdünnungspuffer zum Aufnehmen der Extrakte.

LiOH	25,2 g/21
Brij	4,0 ml/21
Phenol 80 %	2,0 ml/21

Tab. 5. Regenerierlösung.

Natriumacetat	82,03 g/l
Essigsäure 100 %	25,00 ml/l
NaOH (konz.)	nach Bedarf zur pH-Einst.
pH	5,51

Tab. 6. Natriumacetatpuffer für das Ninhydrinreagenz.

Ethylenglycol-monomethylether	1500 ml/21
Ninhydrin	40 g/21
Na-Acetat-Puffer	500 ml/21
$TiCl_3$ 15 % in HCl	20 ml/21

Tab. 7. Ninhydrinreagenz.

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch die automatische Integration der Peakflächen (photometrische Messung der Absorption bei 570 nm). Die relative Empfindlichkeit des Detektors für die einzelnen Aminosäuren wurde mit einem Standardgemisch von Aminosäuren (Amino-Acid-Standard, Benson Co., USA) bestimmt.

2.10. Cysteinoxidation

Die Oxidation von Cystein durch Protoporphyrin IX erfolgte im Wasserbad bei 25°C und leichter Luftdurchspülung. Das Reaktionsmedium enthielt in 10 ml: 60 % Methanol, 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 10 µmol Cystein und 30 µM Protoporphyrin IX-dimethylester. Protoporphyrin IX-dimethylester wurde in Chloroform gelöst, im Rotationsverdampfer auf einer großen Oberfläche angetrocknet und anschließend in Methanol aufgelöst.

Die Belichtung erfolgte mit 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots von 500 µl entnommen und mit 500 µl Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Die Bestimmung von Cystein und der Oxidationsprodukte erfolgte mit dem Aminosäureanalysator mit dem folgenden Trennprogramm.

SCHRITTE ▼ / FUNKTIONEN ►	PUFFER A	PUFFER B	PUFFER C	PUFFER D	PUFFER E	PUFFER F	REG.-LÖS. G	PUFFERPUMPE	NIN.-PUMPE	PROBENAUFG.	TEMP. t_1	TEMP. t_2	TEMP. t_3	SCHREIBER	KÜHLW.-VENT.	SICHERH.-ABS.	INTEGRATOR	FREI	FREI	FREI	ZEIT IN MINUTEN
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	○	●	○	○	○	○	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	○	○	1
2	○	●	○	○	○	○	○	●	●	○	●	○	○	●	○	●	●	○	○	○	2 4
3	○	●	○	○	○	○	○	●	●	○	○	●	○	●	○	●	●	○	○	○	5
4	○	○	●	○	○	○	○	●	●	○	○	●	○	●	○	●	●	○	○	○	2 0
5	○	○	○	○	○	●	○	●	●	○	○	●	○	●	○	●	●	○	○	○	5
6	○	●	○	○	○	○	○	●	●	○	○	●	○	●	○	●	●	○	○	○	5
7	○	●	○	○	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	●	○	○	○	○	○	1 5
8	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	3
9	○	●	○	○	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	3

Tab. 8. Programmeinstellung zur Bestimmung von Cystein und der Oxidationsprodukte.

2.11. Protonenpumpen bei mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die bei Hager und Helmle (1981) beschriebene Methode. 10 g Maiskoleoptilen wurden in 100 ml Plasmolysemedium (400 mM Saccharose, 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) infiltriert, mit einer Rasierklinge in Homogenisiermedium (300 mM Saccharose, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, 20 mM Ascorbinsäure, 2,5 mM DTT, 2 mM Magnesiumsulfat und 10 mM EGTA, pH 7,5) zerkleinert, durch 4 Lagen Verbandsmull gepresst und das Filtrat 15 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals 30 min bei 143 000 x g zentrifugiert, das Sediment in 2,8 ml Außenmedium (50 mM KCl, 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 300 mM Saccharose, pH 7,5) aufsuspendiert, gepottert und auf 12 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Die Zugabe von Protoporphyrin IX-Na_2-Salz erfolgte vor Belichtungsbeginn. Die Proben wurden im Eisbad mit einem Diaprojektor (Braun Paximat S) mit gefiltertem Blaulicht (Filter Typ AL Nr. 231635; λ_{max} 447 nm, Jenaer Glaswerk, Schott) mit 5,85 mW x cm^{-2} belichtet. Die Zugabe von GSH (10 mM) erfolgte nach Beendigung der Belichtung mit anschließender Inkubation bei 21°C über 10 min. Nach Zugabe von Neutralrot (40 µM) wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP (1 mM) gestartet. Die Kinetik der Absorptionsänderung wurde als Differenzspektrum (430 nm gegen 465 nm) im Dual-Wavelength-Verfahren im 2-Strahlphotometer (Double Beam/Difference/Dual Wavelength Recording Spectrometer UV-300, Fa. Shimadzu) gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der Chlorella-Mutanten

Im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 3 und 4) zeigen beide Mutanten keine intakten intraplastidären Membransysteme. Mit dem Fehlen von Chlorophyll und bei der weißen Mutante auch von Carotinoiden ist demnach auch kein normaler Thylakoidaufbau möglich. Die übrigen intrazellulären Organellen zeigen bei beiden Mutanten den üblichen bekannten Bau.

Abb. 3. Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der gelben Chlorella-Mutante.
Zellkern (K); Kernhülle (KH); Lipidvakuole (L); Mitochondrium (M); Intraplastidäre Membranstrukturen (MS); Plastid (P); Plastidenhülle (PH); Plasmalemma (PL); Zellwand (ZW).

Abb. 4. Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der weissen Chlorella-Mutante.
Zellkern (K); Kernhülle (KH); Lipidvakuole (L); Mitochondrium (M); Intraplastidäre Membranstrukturen (MS); Plastid (P); Plastidenhülle (PH); Plasmalemma (PL); Zellwand (ZW).

3.2. Reaktionen der Mutanten auf Licht

3.2.1. Sauerstoffaufnahme

Bei Weißlichtbestrahlung beider Mutanten wird die Sauerstoffaufnahmerate sofort erhöht und bei Dunkelheit geht sie wiederum sofort auf ihren Ausgangswert zurück. Im wiederholten Licht-Dunkelwechsel erscheint die Sauerstoffaufnahme als "Treppenkurve", wobei die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme-

rate bei abnehmender Sauerstoffkonzentration im Medium geringer wird (Abb. 5).

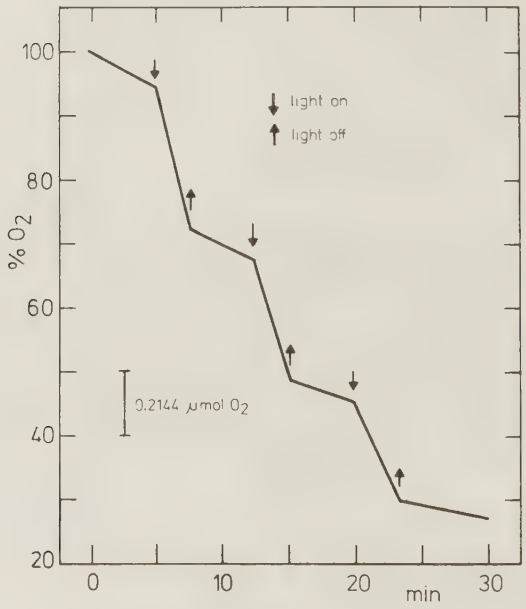

Abb. 5. Lichtabhängige Sauerstoffaufnahme bei der gelben Chlorella-Mutante.
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.2.2. ATP-Gehalt

Unter dem Aspekt einer generellen Stoffwechselbeeinflussung durch Weißlicht war es wünschenswert zu erfahren, ob Korrelationen zwischen der gesteigerten Sauerstoffaufnahme und dem ATP-Gehalt bestehen. Bei beiden Mutanten war jedoch keine signifikante Änderung des ATP-Spiegels bei Weißlichtbestrahlung festzustellen (Abb. 6 und 7).

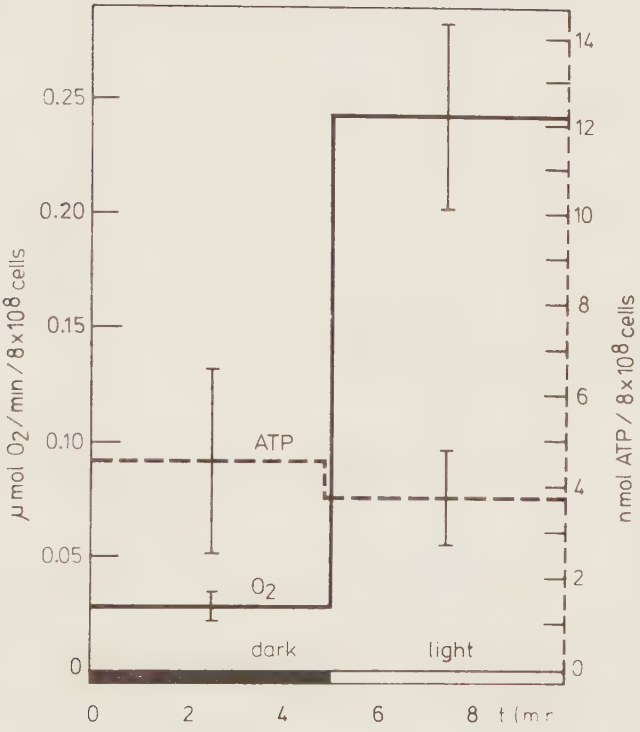

Abb. 6. Sauerstoffaufnahme und ATP-Gehalt der gelben Chlorella-Mutante im Dunkeln und im Licht. 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

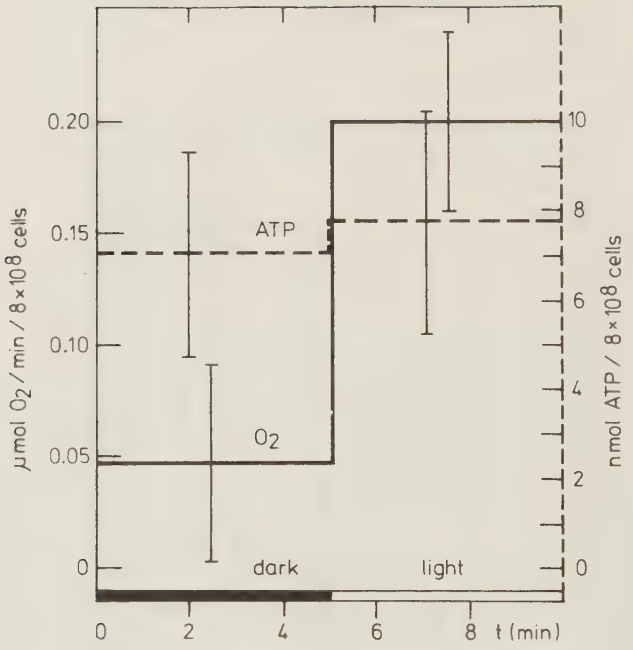

Abb. 7. Sauerstoffaufnahme und ATP-Gehalt der weißen Chlorella-Mutante im Dunkeln und im Licht. 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.2.3. Atmung

Die Messung der CO_2-Abgabe im URAS bei Dunkelheit ergab für die weiße Mutante eine Atmungsrate von 0,099 /umol CO_2 x min^{-1}/ 8 x 10^8 Zellen und für die gelbe Mutante 0,089 /umol CO_2 x min^{-1}/8 x 10^8 Zellen. Bei Weißlichtbestrahlung ist in beiden Fällen keine Änderung der CO_2-Abgabe festzustellen.

Die Zugabe der Atmungsgifte SHAM und CN^-, in Abb. 8 dargestellt am Beispiel der gelben Mutante, zeigt, daß dadurch die Atmung der Zellen im Dunkeln nahezu vollständig gehemmt wird, die lichtabhängige Sauerstoffaufnahmerate aber der Kontrolle ohne Atmungsgifte entspricht. Der Lichteffekt ist demnach ein von der Atmung unabhängig ablaufender Prozeß.

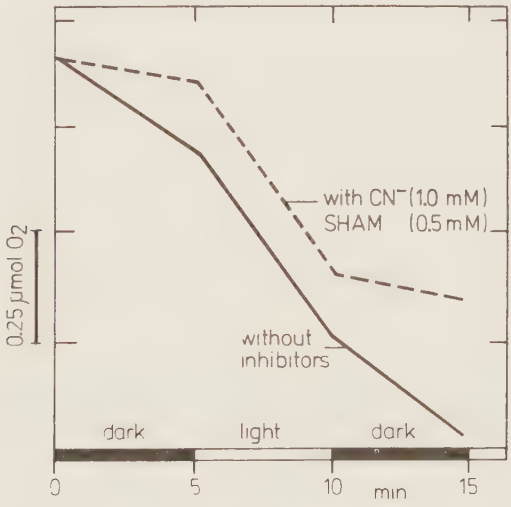

Abb. 8. Lichtabhängige Sauerstoffaufnahme bei Zusatz der Atmungsgifte Cyanid und SHAM (gelbe Mutante). 8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.3. Identifizierung des Photorezeptors

3.3.1. Wirkungsspektren

Bei lichtinduzierbaren und lichtabhängigen Effekten stellt sich die Frage nach dem verantwortlichen Photorezeptor. Durch Aufnahme eines Wirkungsspektrums sind Aussagen über die chemische Konstitution eines Photorezeptors möglich.

Beide Mutanten wurden mit monochromatischem Licht in je 15 Versuchsreihen im Bereich von 350 nm bis 550 nm bestrahlt. Bei maximaler Lichtenergie (3,5 mW x cm^{-2}) konnte keine Sättigung des Effekts bei 400 nm festgestellt werden.

Die maximale Förderung der Sauerstoffaufnahmerate tritt demnach im Bereich von 400 nm ein (Abb. 9 und 10). Die Wirksamkeit des Lichts fällt sowohl zum kurzwelligen Blau als auch zum Grün hin ab.

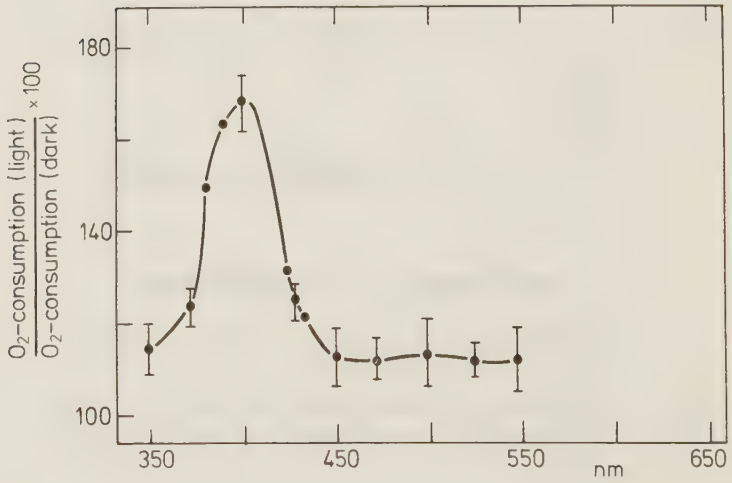

Abb. 9. Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Sauerstoffaufnahme bei der gelben Chlorella-Mutante.
8 x 10^8 Zellen, Bestrahlung mit 3,5 mW x cm^{-2}.

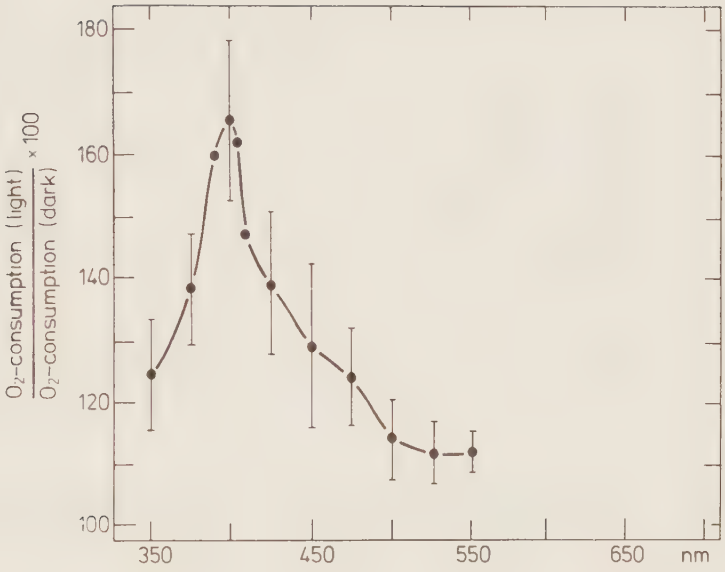

Abb. 10. Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Sauerstoffaufnahme bei der weißen Chlorella-Mutante.
8 x 10^8 Zellen, Bestrahlung mit 3,5 mW x cm^{-2}.

3.3.2. Absorptionsspektren von 80 % Acetonextrakten

In 80 % Aceton lassen sich Pigmente extrahieren, deren Absorptionsspektren mit den Wirkungsspektren vergleichbar sind. Die Extrakte zeigen ein deutliches Maximum bei 400 nm (Abb. 11 und 12) und kleinere Maxima im längerwelligen Bereich. Die Maxima bei 449 nm und 476 nm der gelben Mutante sind auf Carotinoide zurückzuführen.

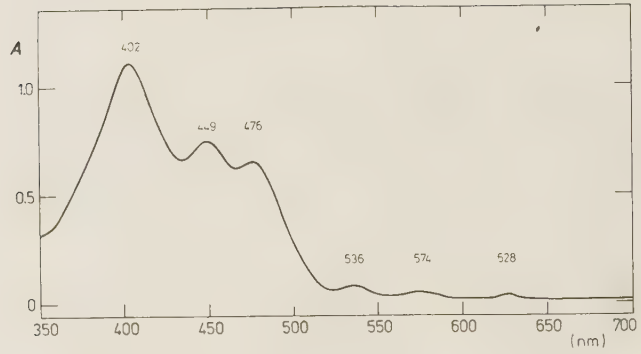

Abb. 11. Absorptionsspektrum eines 80 % Acetonextraktes der gelben Chlorella-Mutante.

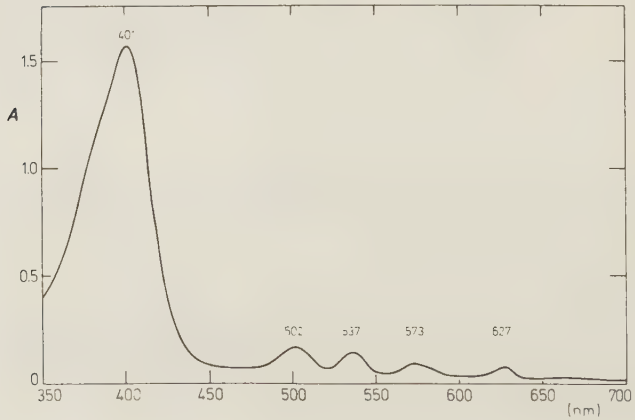

Abb. 12. Absorptionsspektrum eines 80 % Acetonextraktes der weißen Chlorella-Mutante.

3.3.3. Fluoreszenzspektren von 80 % Acetonextrakten

Schon bei Blaulichtbestrahlung in vivo war eine deutliche rötliche Fluoreszenz festzustellen. Die Emissionsspektren (Anregung 400 nm) der 80 % Acetonextrakte zeigen bei der weißen Mutante ein Maximum bei 632 nm und bei der gelben Mutante ein Maximum bei 631 nm. Das Anregungsspektrum zeigt bei beiden Mutanten ein deutliches Maximum bei 408 nm (Abb. 13 und 14). Aus Absorptions- und Fluoreszenzspektren wird ersichtlich, daß Porphyrine in den Mutanten vorliegen.

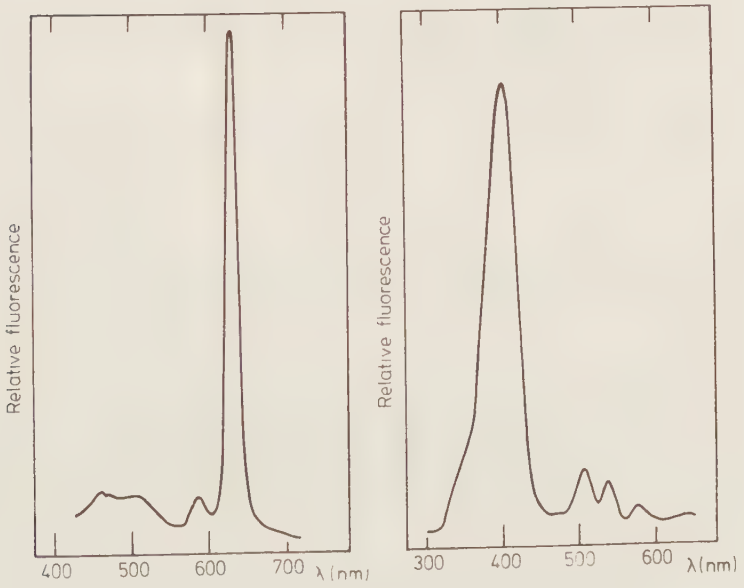

Abb. 13. Emissionsspektrum (links; Anregung 400 nm) und Anregunsspektrum (rechts; Emission 632 nm) eines 80 % Acetonextraktes der gelben Chlorella-Mutante.

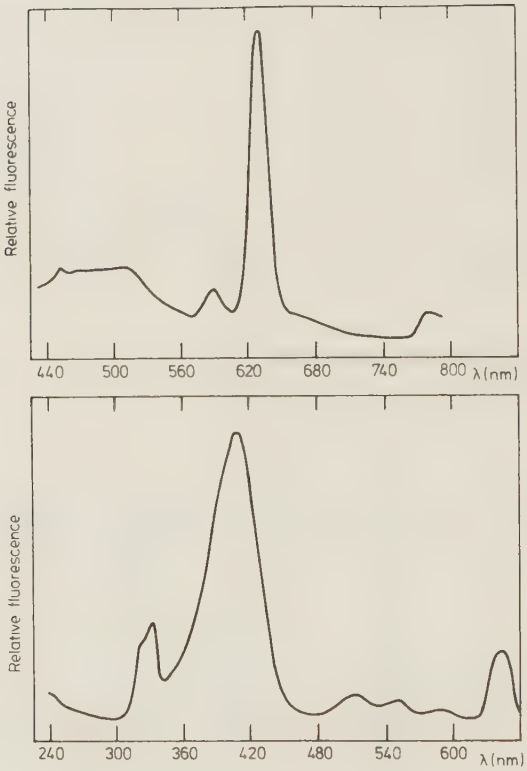

Abb. 14. Emissionsspektrum (oben; Anregung 400 nm) und Anregungsspektrum (unten; Emission 632 nm) eines 80 % Acetonextraktes der weißen Chlorella-Mutante.

3.3.4. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Pigmentextrakte

Aus den Absorptions- und Fluoreszenzspektren der 80 % Acetonextrakte kann man auf Porphyrine schließen, die von beiden Mutanten akkumuliert werden. Zur genaueren Pigmentcharakterisierung wurden diese Extrakte deshalb dünnschichtchromato-

graphisch aufgetrennt (Abb. 15). Die Bande 3 bei der weißen und die Banden 3 - 6 der gelben Mutante zeigen bei Blaulichtbestrahlung eine rötliche Fluoreszenz.

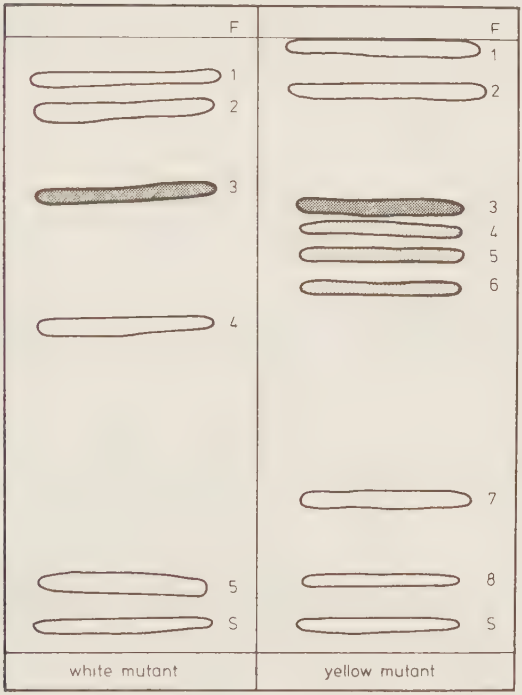

Abb. 15. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Pigmenten der weißen und gelben Chlorella-Mutante.

S = Startlinie; F = Laufmittelfront
Weiße Mutante: 3 Protoporphyrin IX
1,2,4 und 5 nicht weiter identifiziert
Gelbe Mutante: 1 und 2 Carotinoide
3 - 6 Protoporphyrin IX
7 und 8 nicht weiter identifiziert

3.3.5. Porphyrinidentifizierung

Die chromatographisch gereinigten Porphyrine wurden in Diethylether aufgenommen und photometrisch bestimmt. Die Absorptionsspektren (Abb. 16 und 17) zeigen ein deutliches Maximum bei 400 nm (Soret-Bande) und vier kleinere Banden vom aetio-typ Spektrum (IV > III > II > I) eines natürlich vorkommenden Porphyrins (Falk, 1964). Die Absorptionsmaxima und deren Extinktionskoeffizienten stimmen mit einem von Falk (1964) und Smith (1975) beschriebenen Protoporphyrin IX-dimethylester überein. Dieses Pigment wurde deshalb als der vorliegende Photorezeptor angenommen.

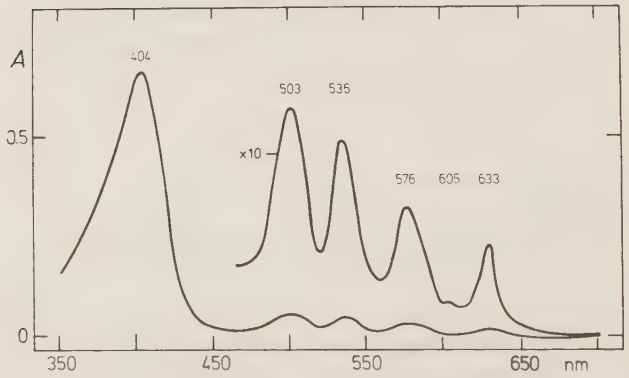

Abb. 16. Absorptionsspektrum des in der gelben Mutante akkumulierten Protoporphyrin IX in Diethylether.

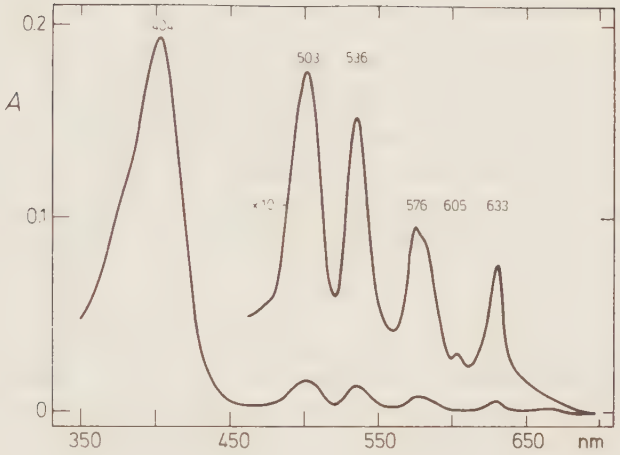

Abb. 17. Absorptionsspektrum des in der weißen Mutante akkumulierten Protoporphyrin IX in Diethylether.

3.4. Nachweis von Singulett-Sauerstoff in den belichteten Chlorella-Zellen

3.4.1. Porphyrine als Photosensibilisatoren

Porphyrine sind gut untersuchte und effektive Photosensibilisatoren (Breitbart und Malik, 1982) und bilden bei Lichtabsorption hochreaktive O_2-Spezies. Bei dieser photochemischen Sauerstoffaktivierung könnnen durch Energie- oder Elektronenübertragung Singulett-Sauerstoff ($^1\triangle_g$ O_2) (Bodannes und Chan, 1979) und/oder Hydroxyl-Radikale (Buettner und Oberley, 1979) oder auch Superoxidradikale (Finazzi-Agrô et al., 1979) gebildet werden. Die Folge einer photochemischen Sauerstoffaktivierung ist in vielen Fällen eine oxidative Zerstörung von Zellbestandteilen. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob bei dem beschriebenen Lichteffekt der erhöhte Sauerstoffverbrauch auf photooxidative Vorgänge zurückführ-

bar ist und welche der beschriebenen hochreaktiven Sauerstoff-Spezies daran beteiligt sein kann.

3.4.2. Einfluß von exogen angebotenem Protoporphyrin IX

Findet bei beiden Chlorella-Mutanten eine porphyrinsensibilisierte photochemische Aktivierung von Sauerstoff und eine damit verbundene Oxidation von Zellbestandteilen statt, so sollte der Lichteffekt durch Erhöhung der Konzentration des in den Mutanten akkumulierten Porphyrins verstärkt werden.

Bei intakten Zellen führt die Applikation von Protoporphyrin IX bei der gelben Mutante zu keiner, bei der weißen Mutante nur zu einer gering gesteigerten Sauerstoffaufnahmerate (Abb. 18). Appliziert man jedoch die gleiche Konzentration aufgebrochenen Zellen, so ist bei der gelben Mutante eine 43%-ige Steigerung und bei der weißen Mutante eine 290%-ige Steigerung der Sauerstoffaufnahmerate gegenüber der jeweiligen Dunkelkontrolle zu beobachten (Abb. 19). Eine Steigerung der Sauerstoffaufnahmerate im Dunkeln war nicht beobachtbar. Offensichtlich wird das zugegebene Protoporphyrin von intakten Zellen nicht aufgenommen, führt aber im zellfreien System zu einer drastischen Verstärkung des Lichteffekts.

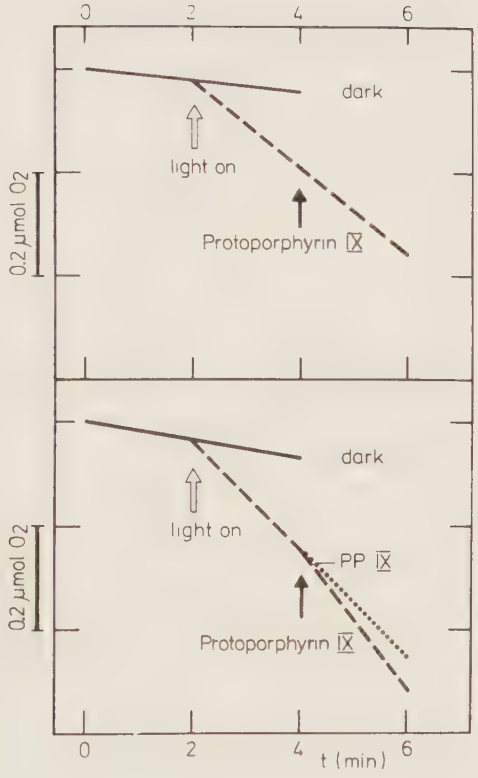

Abb. 18. Einfluß von 25 µM Protoporphyrin IX auf die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme bei der gelben (oben) und der weißen (unten) Chlorella-Mutante.
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

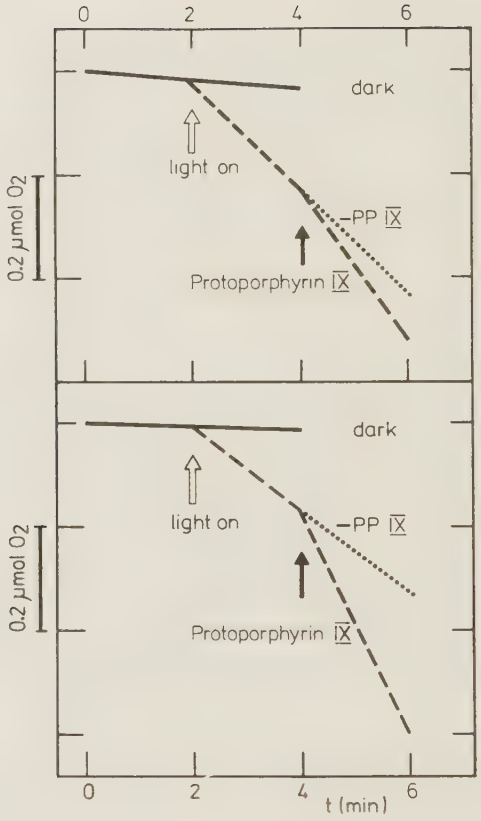

Abb. 19. Einfluß von 25 µM Protoporphyrin IX auf die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme im zellfreien System von 8×10^8 aufgebrochenen Zellen.
Oben: gelbe Mutante; unten: weiße Mutante.
36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.4.3. Einfluß von Quenchern

3.4.3.1. NaN_3 und α -Tocopherol

Bei Zugabe der Singulett-Sauerstoff-Quencher NaN_3 (Jori, 1980; Ito und Ito, 1982; Houba-Herin et al., 1982; Gommers et al., 1982) oder α-Tocopherol (Vitamin E) (Fahrenholtz et al., 1974) wird die lichtbedingte Sauerstoffaufnahme bei beiden Mutanten, in Abb. 20 dargestellt am Beispiel der gelben Mutante, deutlich herabgesetzt. NaN_3 hemmt stärker als α-Tocopherol.

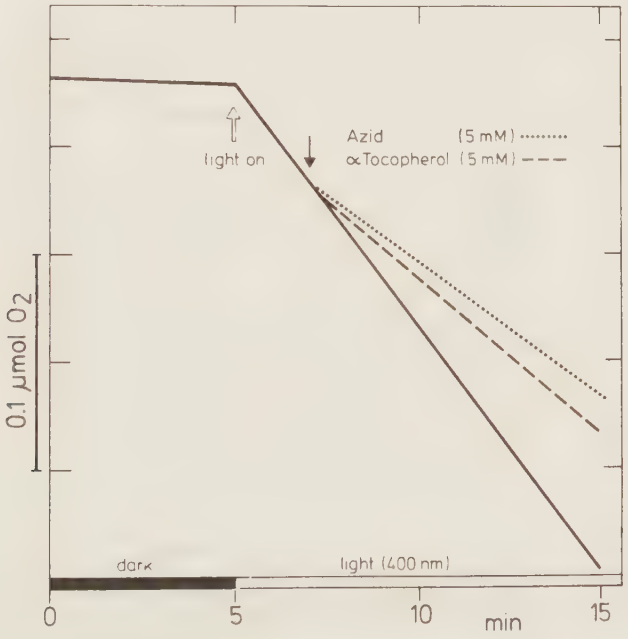

Abb. 20. Hemmung der lichtabhängigen Sauerstoffaufnahme durch Quencher des $^1O_2$ im zellfreien System von 8×10^8 aufgebrochenen Zellen (gelbe Mutante).
3,5 mW x cm^{-2} Blaulicht (400 nm).

3.4.3.2. Imidazol

Die Zugabe des Quenchers Imidazol (Wasserman und Lipshutz, 1979) bewirkt die bei Chauvet et al. (1981) beschriebene Steigerung der Sauerstoffaufnahme, bedingt durch einen Einbau des Singulett-Sauerstoffs in das Molekül. Diese Steigerung ist bei der gelben Mutante mit 152 % größer als bei der weißen Mutante mit 40 % (Abb. 21). Ein Einfluß von Imidazol auf die Dunkelatmung war nicht feststellbar.

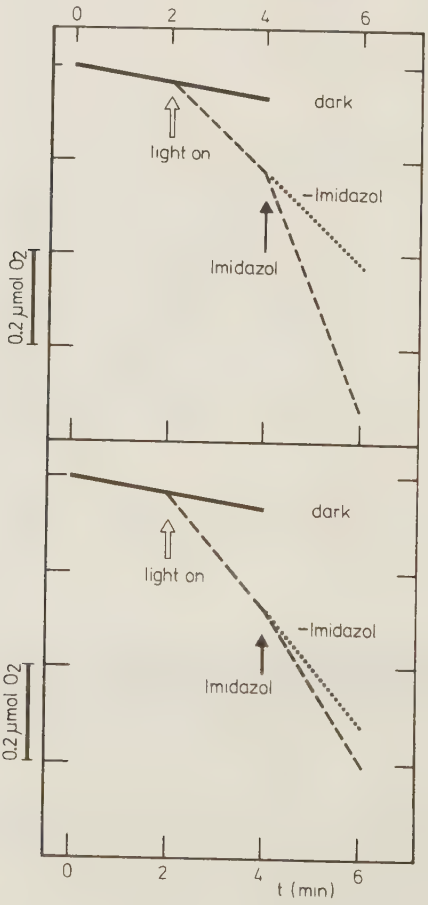

Abb. 21. Steigerung der lichtabhängigen Sauerstoffaufnahme durch den $^1O_2$-Quencher Imidazol bei der gelben (oben) und der weißen (unten) Chlorella-Mutante. 8×10^8 Zel
$36{,}8\ mW \times cm^{-2}$ Weißlicht

3.4.4. Ausschluß von Hydroxyl-Radikalen

Mannit ist ein bekannter und effektiver Quencher von Hydroxylradikalen (Halliwell, 1978; Youngman und Elstner, 1981). Die Ergebnisse in Tab. 9 zeigen aber, daß Mannit, über einen großen Konzentrationsbereich zugegeben, keine signifikante Änderung der Sauerstoffaufnahmerate bei beiden Mutanten verursacht. Zwischen intakten Zellen und zellfreiem System konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Mannit [mM]	gelbe Mutante	weiße Mutante
	O_2-Aufnahme [nmol x min^{-1}/8 x 10^8 Zellen]	
0,0	51,2	44,0
12,5	48,1	43,4
25,0	47,3	42,5
50,0	47,1	40,9
	im zellfreien System	
0,0	40,6	34,3
12,5	39,7	33,9
25,0	38,9	33,7
50,0	36,9	32,6

Tab. 9. Einfluß des Hydroxyl-Radikal-Quenchers Mannit auf die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme der gelben und der weißen Chlorella-Mutante in vivo und im zellfreien System.
36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.4.5. Ausschluß von Superoxidradikalen

Zur Bestimmung der möglichen Einwirkung des Superoxidanions wurde der Effekt der Superoxiddismutase auf die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme getestet. Es wurde bis zu 15 µg/ml Superoxiddismutase aufgebrochenen Zellen beider Mutanten zugegeben, ohne daß eine signifikante Änderung des Lichteffekts erkennbar war (Tab. 10).

Superoxiddismutase		gelbe Mutante	weiße Mutante
µg x ml^{-1}	Units	O_2-Aufnahme [nmol x min^{-1}/8 x 10^8 Zellen]	
0,00	0,00	40,2	33,5
3,75	18,75	40,0	32,5
7,50	37,50	39,3	32,9
15,00	75,00	39,6	32,2

Tab. 10. Einfluß der Superoxiddismutase auf die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme im zellfreien System von 8 x 10^8 aufgebrochenen Chlorella-Zellen. 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.5. Oxidation von Zellbestandteilen

3.5.1. Membran-Lipide

Die Weißlichtbestrahlung führt bei beiden Mutanten zu einer Oxidation von Membran-Lipiden. Diese wurde durch Bestimmung von Malondialdehyd, einem Abbauprodukt mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Buege und Aust, 1978) nachgewiesen.

Die Oxidation setzt sofort mit Belichtungsbeginn ein und verläuft über sechs Stunden linear. In Dunkelheit findet keine Lipidperoxidation statt (Abb. 22 und 23).

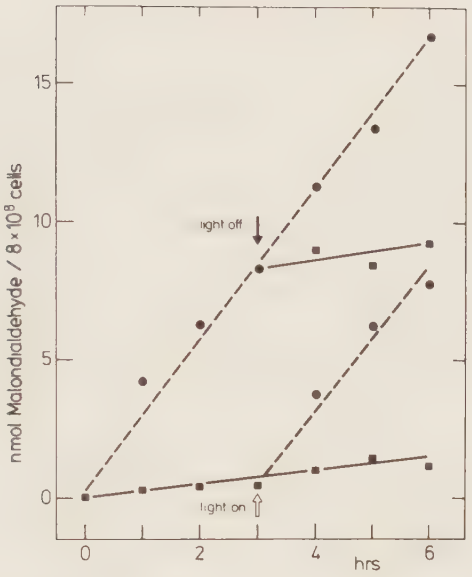

Abb. 22. Lichtabhängiger oxidativer Membranabbau: Bildung von Malondialdehyd (gelbe Mutante).
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

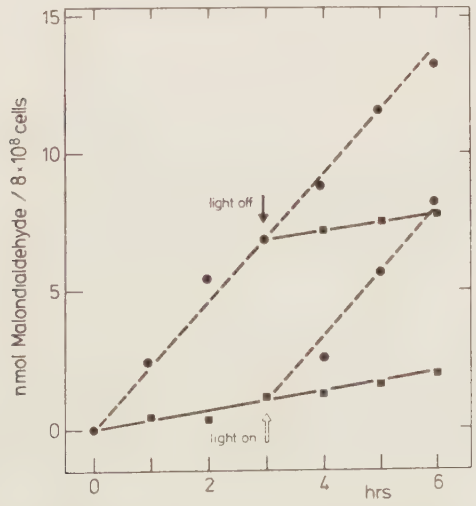

Abb. 23. Lichtabhängiger oxidativer Membranabbau: Bildung von Malondialdehyd (weiße Mutante).
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.5.1.1. Einfluß von Quenchern und N_2

In Abb. 24 und 25 ist der Einfluß der Singulett-Sauerstoff-quencher NaN_3 (vgl. 3.4.3.1.) und DABCO (Foote, 1979) auf die lichtabhängige Lipidperoxidation dargestellt. Sowohl bei der gelben als auch bei der weißen Mutante wird der Membranabbau durch Azid und DABCO deutlich gehemmt. Die Hemmung durch 25 mM DABCO ist stärker als die durch 5 mM Azid.

Eine nur sehr geringe, von der Dunkelkontrolle kaum unterscheidbare Lipidperoxidation findet in N_2-Atmosphäre statt.

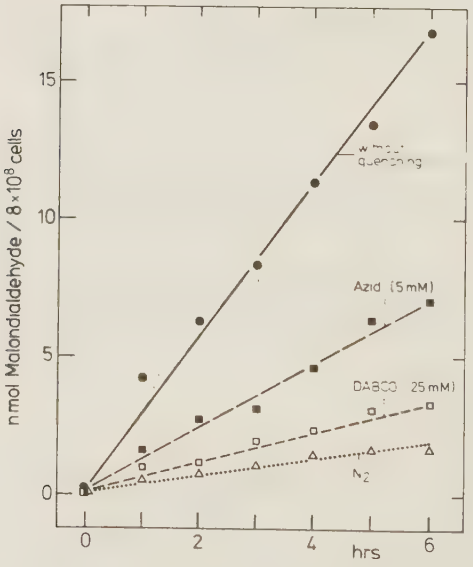

Abb. 24. Hemmung der lichtabhängigen Malondialdehydbildung durch $^1O_2$-Quencher und N_2 bei der gelben Chlorella-Mutante.
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

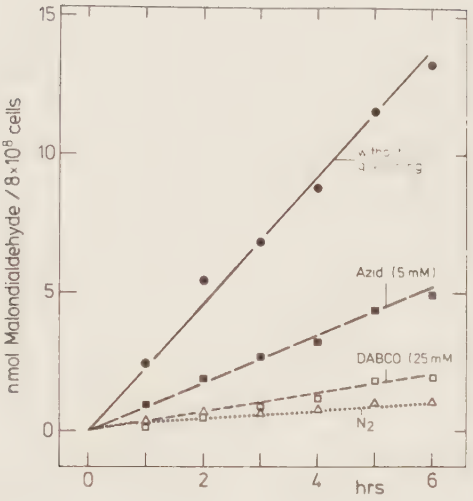

Abb. 25. Hemmung der lichtabhängigen Malondialdehydbildung durch $^1O_2$-Quencher und N_2 bei der weißen Chlorella-Mutante.
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.5.2. Freie Aminosäuren

Im Weißlicht ist in intakten Zellen der gelben Mutante eine Abnahme freier Aminosäuren feststellbar. Von den bestimmten Aminosäuren waren davon ausschließlich Histidin, Tryptophan, Methionin und Tyrosin betroffen. Die Abnahme-Kinetik ist durch eine schnelle Anfangsphase gekennzeichnet (bis ca. 1 h) und verläuft dann deutlich langsamer (Abb. 26).

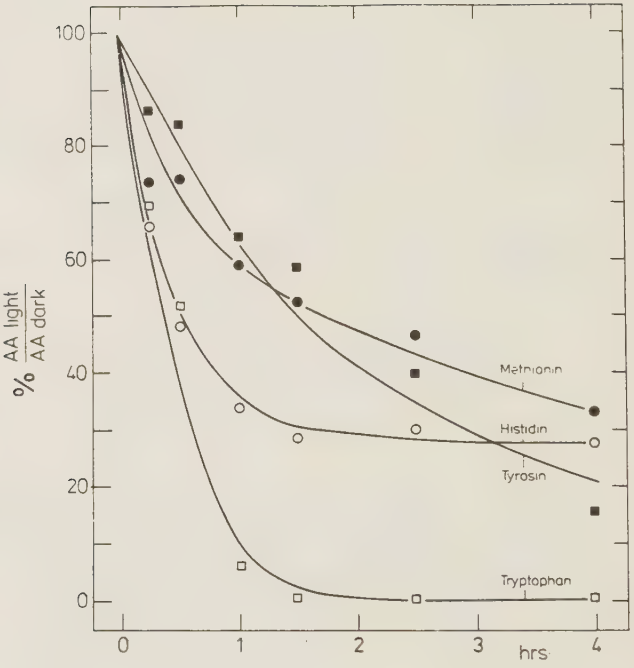

Abb. 26. Lichtabhängiger oxidativer Abbau von freien Aminosäuren (gelbe Mutante) in vivo.
8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.5.2.1. Einfluß von Quenchern

Wie bei der lichtbedingten Lipidperoxidation ist auch bei dem Abbau freier Aminosäuren in den Zellen von Chlorella eine deutliche Hemmwirkung durch die Quencher des Singulett-Sauerstoffs zu beobachten, allerdings ist hier der Effekt von 5 mM Azid stärker als der von 25 mM DABCO (Abb. 27).

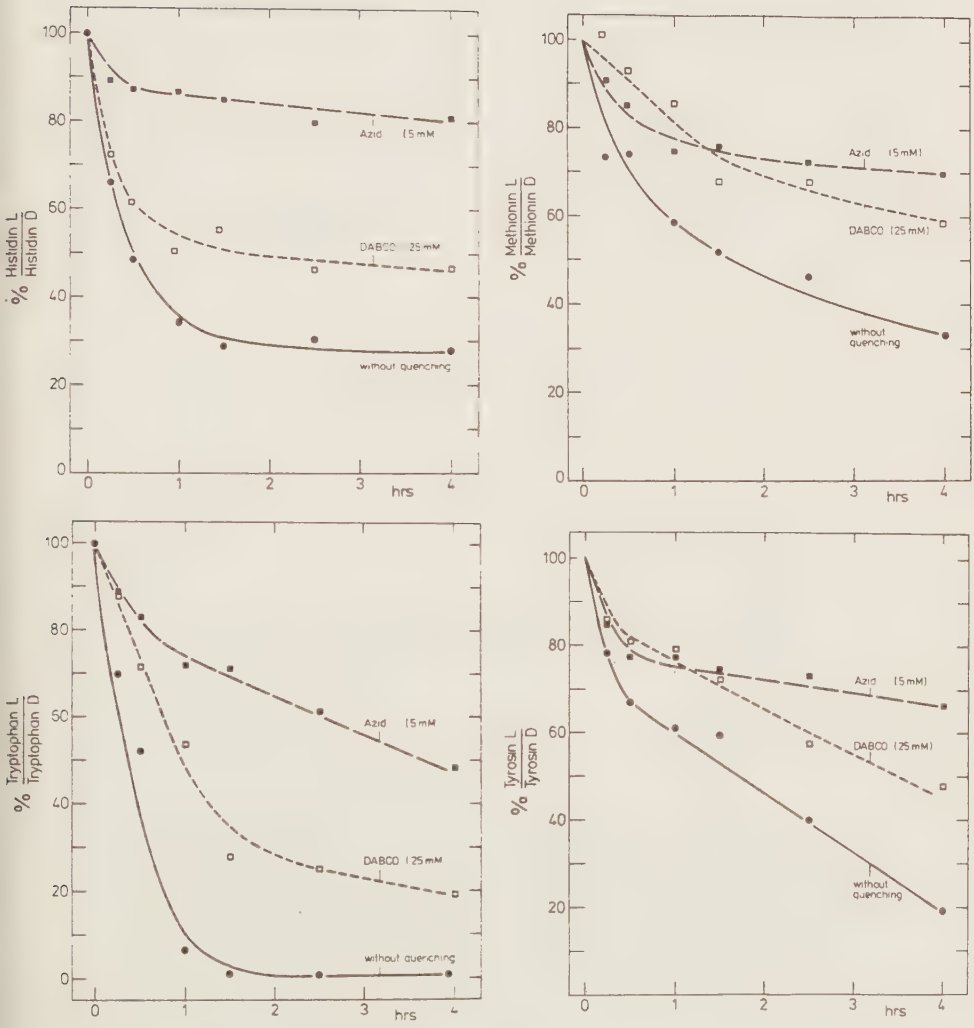

Abb. 27. Hemmung des lichtabhängigen Abbaus freier Aminosäuren durch $^1O_2$-Quencher (gelbe Mutante). 8×10^8 Zellen, 36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.

3.6. Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf Cystein

In einem in-vitro-Versuch wurde der Einfluß von Singulett-Sauerstoff auf die Aminosäure Cystein getestet. Die photochemische Aktivierung von Sauerstoff erfolgte durch Belichtung von Protoporphyrin IX. Wie in Abb. 28 dargestellt, ist eine sofort einsetzende Oxidation von Cystein zu beobachten. Die gebildeten Reaktionsprodukte Cystin und Cysteinsäure zeigen, daß der Singulett-Sauerstoff mit der Sulfhydrilgruppe reagiert.

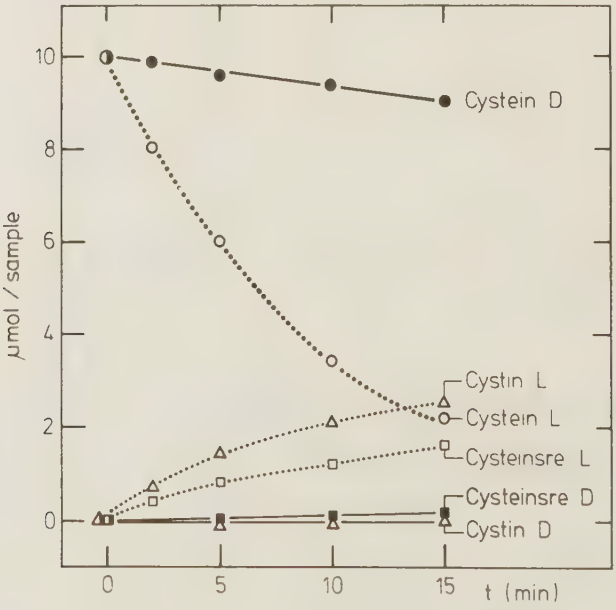

Abb. 28. Lichtabhängige Oxidation von Cystein und Bildung von Cystin und Cysteinsäure.
36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.
Zusammensetzung des Reaktionsmediums (10 ml):
50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 60 % Methanol,
10 µmol Cystein, 30 µM Protoporphyrin IX.

Daß Singulett-Sauerstoff als reaktives Zwischenprodukt an dieser Reaktion beteiligt ist, zeigt ihre Hemmbarkeit durch NaN_3 (Abb. 29).

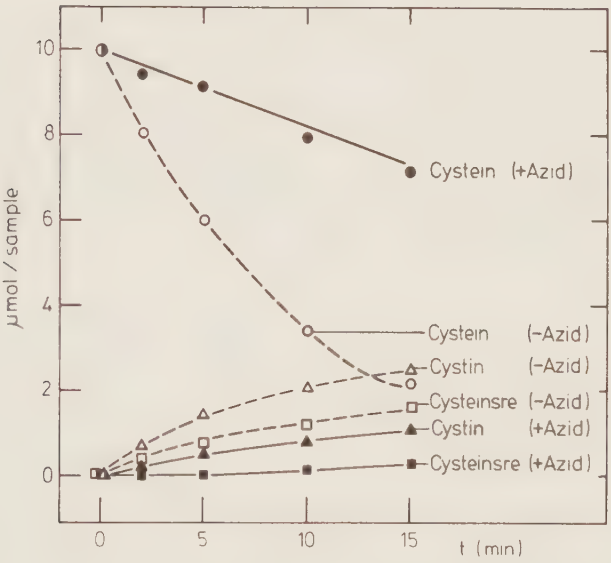

Abb. 29. Einfluß von 10 mM NaN_3 auf die lichtabhängige Cysteinoxidation, Cystinbildung und Cysteinsäurebildung.

36,8 mW x cm^{-2} Weißlicht.
Zusammensetzung des Reaktionsmediums (10 ml):
50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 60 % Methanol, 10 µmol Cystein, 30 µM Protoporphyrin IX, 10 mM NaN_3.

3.7. Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf die ATP-getriebenen Protonenpumpen bei mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile

Die Wirkung von durch Protoporphyrin IX photochemisch aktivierten Singulett-Sauerstoff auf Protonentransportsysteme an Zellmembranen wurde an mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile (Hager und Hemle, 1981) untersucht.

Eine Vesikelsuspension mit 25 µM Protoporphyrin IX zeigt im Dunkeln die von Hager et al. (1980) beschriebene intravesikuläre Ansäuerung. Wird eine solche Vesikelsuspension aber für 1 min mit Blaulicht bestrahlt, so ist dieser Prozeß stark gehemmt. Eine an die Belichtung anschließende 10-minütige Inkubation mit GSH (10 mM) vermag diese Hemmung teilweise wieder aufzuheben (Abb. 30).

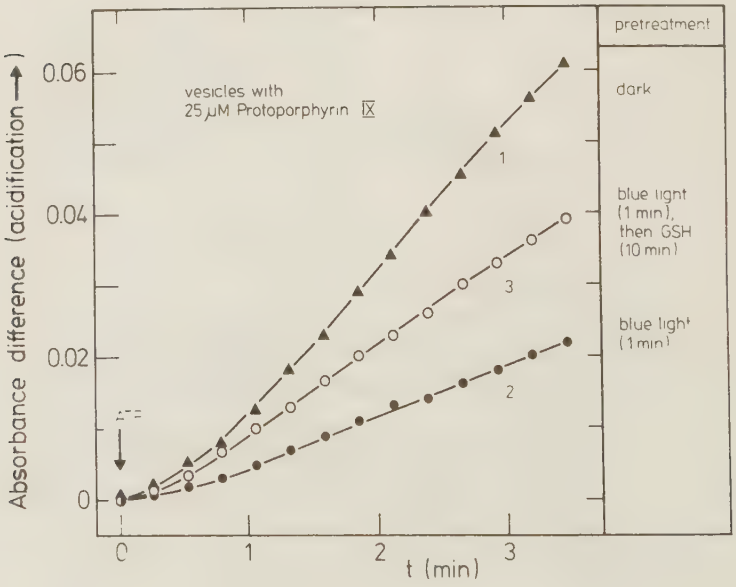

Abb. 30. Intravesikuläre Ansäuerung bei mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile nach ATP-Zugabe in Anwesenheit von 25 µM Protoporphyrin IX im Dunkeln, im Licht und bei Inkubation mit GSH (10 mM).
5,85 mW x cm^{-2} Blaulicht (447 nm).

4. Diskussion

Eine Stimulierung der Sauerstoffaufnahme durch Blaulicht bei Chlorella pyrenoidosa ist bereits von Emerson und Lewis (1943) beschrieben worden. Weitere Untersuchungen wurden an diesem Objekt dann von Kowallik (1969) und Picket und French (1967) durchgeführt. In diesen Arbeiten wird unter anderem gezeigt, daß nach Hemmung der Photosynthese durch DCMU (Kowallik und Schätzle, 1980) oder bei Pigmentmutanten ohne Chlorophyll (Kowallik und Gaffron, 1966; Kowallik, 1967; Kamiya und Miyachi, 1974; Kowallik und Schätzle, 1980) eine lichtstimulierte O_2-Aufnahme auftritt. Diese wird auf eine Atmungssteigerung zurückgeführt. Ein dafür verantwortlicher Photorezeptor konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden; diskutiert wurden vor allem Flavine und Carotinoide.

In vorliegender Arbeit wurde an der gelben und der weißen Mutante von Chlorella vulgaris eine blaulichtgesteigerte Sauerstoffaufnahme nachgewiesen, die offensichtlich nicht auf eine Atmungssteigerung zurückzuführen ist. Dafür spricht schon, daß nach Hemmung der Dunkelatmung durch SHAM und KCN die lichtbedingte O_2-Aufnahme unverändert bleibt (Abb. 8). Ferner ist festzustellen, daß im Licht keine erhöhte CO_2-Abgabe auftritt (3.2.3.). Darüber hinaus ist im Licht auch keine Erhöhung des ATP-Spiegels festzustellen (Abb. 6 und 7), im Unterschied zu den Befunden von Kowallik und Scheil (1976). Die Annahme, daß die O_2-Aufnahme auf photooxidative Vorgänge zurückzuführen ist, ist bereits auf Grund dieser Ergebnisse berechtigt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß Kandler und Schötz schon 1956 vermuteten, daß eine lichtbedingte O_2-Aufnahme bei einer Pigmentmutante von Chlorella vulgaris, die mit einer Pigmentzerstörung verbunden war, durch photooxidative Vorgänge hervorgerufen werde.

Um eine Aussage über den dabei wirksamen Photorezeptor zu bekommen, ist der Vergleich des Wirkungsspektrums mit dem Absorptionsspektrum in Frage kommender Pigmente angebracht (Rau, 1980a). Bei den untersuchten Mutanten tritt die maximale

Förderung der Sauerstoffaufnahme bei Bestrahlung mit 400 nm ein. Die Wirksamkeit des Lichts fällt sowohl zum kurzwelligen Blau als auch zum Grün hin ab (Abb. 9 und 10). Die Übereinstimmung der beiden Wirkungsspektren spricht dafür, daß der Photorezeptor für den oben beschriebenen Blaulichteffekt bei beiden Mutanten identisch ist. Im Vergleich mit anderen für Blaulichtreaktionen aufgestellten Wirkungsspektren besteht Übereinstimmung mit der lichtinduzierten Akkumulation von Dictyostelium discoideum (Häder und Poff, 1979) und mit der Induktion der Carotinoidbiosynthese bei Mycobacterium marinum (Batra und Rilling, 1964) und Myxococcus xanthus (Burchard und Hendricks, 1969), nicht dagegen mit den von Kowallik (1967, 1969) und Pickett und French (1967) aufgestellten Wirkungsspektren der gesteigerten Sauerstoffaufnahme bei Chlorella-Zellen. Viele in der Literatur beschriebene Blaulichteffekte zeigen Effektivitätsmaxima bei 370 nm bis 380 nm und drei weitere Maxima oder zumindest Schultern im Bereich zwischen 400 und 500 nm (Rau, 1980a). Aus diesem Grund werden vor allem Flavine und Carotinoide als die verantwortlichen Photorezeptoren angesprochen; sie scheiden aber wegen des anders gestalteten Wirkungsspektrums für die blaulichtabhängige Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei den beiden Chlorella-Mutanten als mögliche Photorezeptoren aus.

Die Absorptionsspektren der aus beiden Mutanten extrahierten Pigmente (Abb. 11 und 12) zeigen mit den gemessenen Wirkungsspektren vor allem im Bereich von 400 nm deutliche Übereinstimmung. Dieses Pigment wird daher als der für den Lichteffekt verantwortliche Photorezeptor angesehen. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung zeigt dieses Pigment ein Absorptionsmaximum bei 404 nm (Soret-Bande) und vier kleinere Banden vom aetio-typ Spektrum im Bereich von 500 nm bis 650 nm (Abb. 16 und 17). Dies deutet an, daß ein metallfreies Porphyrin vorliegen muß. Von den nicht komplexierten Porphyrinen kommen nur die Isomere I und III von Uro- und Coproporphyrin in biologischen Materialien vor (Falk, 1964). Die Bestimmung der Absorptionsmaxima und deren spezifischer Extinktionskoeffizienten (Smith, 1975) ergibt volle Übereinstimmung mit den

betreffenden Eigenschaften des Protoporphyrin IX-dimethylesters. Kowallik (1967) erwähnt das Vorhandensein von Porphyrinen in der gelben Chlorella-Mutante, führt den Lichteffekt jedoch nicht auf dieses Pigment zurück.

Daß Porphyrine als Photorezeptoren für Blaulichteffekte fungieren können, zeigt die Arbeit von Poff und Butler (1974), in der für die Phototaxis von Dictyostelium discoideum ein Hämprotein identifiziert wurde. Weitere Wirkungsspektren, etwa die der lichtinduzierten Carotinoidbiosynthese sprechen ebenfalls für Porphyrine (Burchard und Dworkin, 1966; Burchard und Hendricks, 1969; Howes und Batra, 1970). Daneben wird auch Chlorophyll(id) als Photorezeptor für die Chloroplastenentwicklung und die damit zusammenhängende Entwicklung der Photosynthesepigmente angenommen (Cohen und Schiff, 1976; Kirk und Tilney-Bassett, 1978). Als Photorezeptor der Chloroplastenentwicklung und der Chlorophyllbiosynthese diskutieren Brinkmann und Senger (1980) Protoporphyrin IX. Dieses Pigment wurde vor allem auf Grund der Übereinstimmung von Absorptions- und Wirkungsspektrum als Photorezeptor vorgeschlagen. In dieser Untersuchung wird allerdings wenig über die biochemisch ablaufenden Prozesse bei der Primärreaktion ausgesagt.

Auch in der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß in den untersuchten Chlorella-Mutanten Protoporphyrin IX als der für die blaulichtabhängige Sauerstoffaufnahme verantwortliche Photorezeptor fungiert. In diesem Zusammenhang ist anzuführen, daß Porphyrine neben anderen Pigmenten, wie Flavine (Vargas et al., 1982; Heelis, 1982), Psoralen, Hypericin, lineare Tetrapyrrole, Pyridoxal und Metallionen, wichtige endogene Photosensibilisatoren (Jori, 1980) sind. Sie bilden bei Lichtabsorption hochreaktive Sauerstoffspezies (vgl. dazu Abschnitt 3.4.1.). Die Bildung von Singulett-Sauerstoff kann sowohl bei der gelben als auch bei der weißen Mutante nachgewiesen werden. Durch Quencher des Singulett-Sauerstoff wird die lichtabhängige Sauerstoffaufnahme deutlich gehemmt (Abb. 20), wogegen die Bildung von Hydroxylradikalen (3.4.4.) und Superoxidanionen

(3.4.5.) ausgeschlossen werden kann. Im übrigen kann der Lichteffekt in den beiden Mutanten durch exogen angebotenes Protoporphyrin drastisch verstärkt werden (Abb. 19).

Diese porphyrinsensibilisierte Aktivierung von Singulett-Sauerstoff führt zu vielfältigen Zellschädigungen. So wird unter anderem über die Zerstörung von Biomembranen (Lamola, 1976), Aminosäuren (Gorman und Rodgers, 1981) und Proteinen (Dubbelman et al., 1981) berichtet. Bei den hier untersuchten Chlorella-Mutanten führt die Bildung von Singulett-Sauerstoff zu einer oxidativen Zerstörung von Membranlipiden (Abb. 22 und 23). Daß diese energiereiche Sauerstoffspezies an dieser Reaktion beteiligt ist, zeigt die strikte Lichtabhängigkeit, die Notwendigkeit des Vorhandenseins von molekularem Sauerstoff und die Hemmbarkeit durch Quencher (Abb. 24 und 25). Auch die Tatsache, daß nur bestimmte freie Aminosäuren, nämlich Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin (Abb. 26) durch diese Sauerstoffspezies photooxidiert werden (Gorman und Rodgers, 1981), spricht ebenso wie die Hemmbarkeit durch die Quencher NaN_3 und DABCO (Abb. 27) für die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff als Intermediärprodukt.

In den bisher dargelegten Ergebnissen kann also bei einer weißen und einer gelben Chlorella-Mutante eine porphyrinsensibilisierte Photooxidation mit Beteiligung von Singulett-Sauerstoff nachgewiesen werden. In diesen chlorophyllfreien Pigmentmutanten wird Protoporphyrin IX offensichtlich auf Grund fehlender Chelatase-Aktivität akkumuliert. Bei Belichtung kommt es daher zu den in den Abschnitten 3.5.1. und 3.5.2. beschriebenen Zellschädigungen. In Chlorella-Zellen vom Wildtyp und allen pflanzlichen Organismen ist Protoporphyrin IX ein Zwischenprodukt in der Chlorophyllbiosynthesekette und wird nicht angereichert. Dieses Pigment liegt in niederer Konzentration vor, kann aber bei Belichtung eine photodynamische Wirkung zeigen.

In Abb. 31 ist die Reaktionskette des bei der gelben und der weißen Mutante beobachtbaren Blaulichteffekts dargestellt: Als Photorezeptor für die blaulichtabhängige Steigerung der Sauerstoffaufnahme fungiert das in beiden Mutanten akkumulierte Protoporphyrin IX. Bestrahlung, vor allem im Spektralbereich von 400 nm, führt zu einer porphyrinsensibilisierten photochemischen Aktivierung von Sauerstoff. Der dabei gebildete energiereiche Singulett-Sauerstoff wird in verschiedene Moleküle eingebaut. Diese Reaktion ist durch Quencher hemmbar.

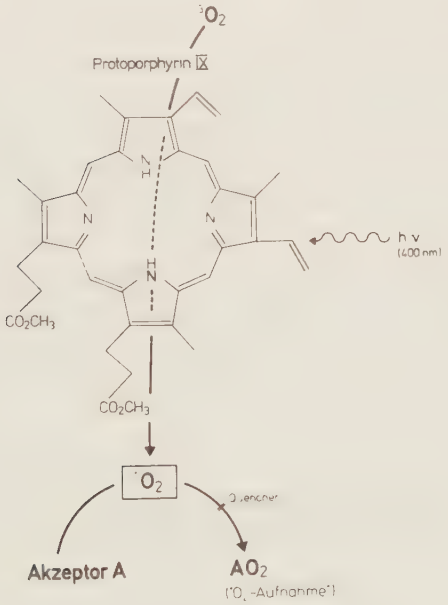

Abb. 31. Reaktionsmechanismus der blaulichtabhängigen Sauerstoffaufnahme in einer weißen und einer gelben Chlorella-Mutante.

Nun lassen sich über die Wirkung der in Abb. 31 dargestellten Singulett-Sauerstoffwirkung noch weitere Aussagen machen. In einem in vitro Versuch konnte gezeigt werden, daß durch Protoporphyrin IX gebildeter Singulett-Sauerstoff mit der Sulfhydrilgruppe von Cystein reagiert (Abb. 28). Als Reaktionsprodukt wird vor allem Cystin gebildet. Diese Reaktion kann durch NaN_3 weitgehend unterbunden werden (Abb. 29), was auf die Beteiligung dieser energiereichen Sauerstoffspezies als Intermediärprodukt schließen läßt. Die Bildung von Cysteinsäure spricht für die Beteiligung von Superoxidradikalen (Typ I-Prozeß: Elektronenübertragung), während die Bildung von Cystin auf einen Typ II-Prozeß (Bildung von Singulett-Sauerstoff) zurückgeführt werden kann (Jori, 1980).

Im Hinblick auf den Stoffwechsel der Zelle ist nun zu fragen, ob Singulett-Sauerstoff über eine Aktivierung bzw. Inaktivierung von SH-Gruppen tragenden Enzymen regulatorische Wirkungen zeigen kann. Hinweise dafür geben die Ergebnisse, die an einem Protonentransportsystem bei mikrosomalen Vesikeln der Maiskoleoptile (Hager et al., 1980; Hager und Helmle, 1981) gewonnen wurden. Hier zeigt eine 1-minütige Blaulichtbestrahlung protoporphyrinhaltiger Vesikel eine starke Hemmung der intravesikulären Ansäuerung. Eine daran anschließende Inkubation mit GSH vermag diese Hemmung wieder aufzuheben (Abb. 30).

Somit ließen sich schnelle lichtabhängige Regulationsmöglichkeiten beim pflanzlichen Streckungswachstum über eine Beeinflussung von Protonenpumpen erklären, die Ionentransportvorgänge auslösen und auch eine Ansäuerung und Plastizitätserhöhung der Zellwand bewirken können. Tatsächlich konnte Cosgrove (1982) schnelle Wachstumshemmungen an etiolierten Keimlingen von Sinapis alba bereits bei 16 sec Blaulichtbestrahlung mit einer lag-Phase von 40 - 60 sec beobachten. Diese schnelle Wachstumshemmung spricht für das Vorhandensein eines photodynamischen Prozesses, wobei - wie oben dargelegt - Singulett- Sauerstoff über die Oxidation von SH-Gruppen die Aktivität der Protonenpumpen hemmen könnte. Durch eine enzy-

matische Reduktion ließe sich dann die im Dunkeln langsamer wiederkehrende ursprüngliche Wachstumsrate erklären. Daß Singulett-Sauerstoff an der Regulation von Wachstumsprozessen beteiligt ist, zeigen weiter Untersuchungen von Koch et al. (1982), die eine chlorophyllsensibilisierte Photooxidation von Auxin nachweisen konnten.

Auch die bei vielen Mikroorganismen durch Blaulicht induzierbare Carotinoidbiosynthese (Rau, 1980b) läßt in einigen Punkten auf das Vorliegen photodynamischer Prozesse und die Einwirkung von Singulett- Sauerstoff schließen. So genügt zur Induktion eine kurze Belichtungszeit; dieser Prozeß läuft temperaturunabhängig ab (Rau, 1980a). Weiterhin ist Sauerstoff für eine optimale Induktion essentiell. Über künstliche Photorezeptoren wie Methylenblau oder Toluidinblau kann auch rotes Licht zu einer Induktion der Carotinoidbiosynthese führen (Rau, 1980a). Diese Farbstoffe sind effektive Photosensibilisatoren, die nach Lichtabsorption Singulett-Sauerstoff bilden (Lechtken, 1974; Ito, 1977; Jori, 1980). Die Tatsache, daß der Singulett-Sauerstoff-Quencher NaN_3 nicht nur die Induktion in situ (Batra und Rilling, 1964; Lang-Feulner und Rau, 1975), sondern auch die Methylenblau-sensibilisierte (Rau, 1980b) hemmt, läßt auf eine Mitwirkung dieser aktiven Sauerstoff-Spezies schliessen. Bereits Batra (1971) sprach dem Singulett-Sauerstoff eine mögliche Beteiligung bei der Induktion zu, ein Nachweis erfolgte aber noch nicht. Nach dem Gesagten könnte der Primäreffekt der lichtinduzierten Carotinoidbiosynthese auf eine Oxidation von SH-Gruppen zurückgeführt werden. Dafür spricht ferner, daß SH-Gruppen blockierende Substanzen, wie PCMB oder PHMB, auch im Dunkeln die Carotinoidbiosynthese induzieren können (Rau, 1967).

Aus den dargestellten Beispielen wird ersichtlich, daß photodynamische Effekte für Pflanzen nicht nur zellschädigende Wirkungen, sondern wichtige physiologische Prozesse induzieren können. Erste Hinweise liegen bei Blaulichtreaktionen bereits vor. So wurde von Nultsch et al. (1982) eine Modellvorstellung entwickelt, wonach die Änderung des Reaktionssinnes bei der

Phototaxis von Anabaena variabilis durch die Singulett-Sauerstoffkonzentration kontrolliert wird.

5. Zusammenfassung

Bei einer gelben (211-11h/20) und einer weißen (125 a) Chlorella-Mutante wurde eine blaulichtabhängige Sauerstoffaufnahme nachgewiesen. Diese ist auch nach Hemmung der mitochondrialen Atmung durch 1 mM KCN und 0,5 mM SHAM zu beobachten. Da außerdem im Licht keine erhöhte CO_2-Abgabe festgestellt wurde, kann eine Atmungssteigerung als Grund für die erhöhte O_2-Aufnahme ausgeschlossen werden.

Das Wirkungsspektrum dieses Blaulichteffekts zeigt bei beiden Mutanten ein Maximum bei 400 nm.

Nach Extraktion der Pigmente konnte mit Fluoreszenz- und Absorptionsspektren Protoporphyrin IX-dimethyl-ester nachgewiesen werden. Dieses Pigment wird in beiden Mutanten wahrscheinlich auf Grund fehlender Chelatase-Aktivität akkumuliert.

Der Lichteffekt kann bei beiden Mutanten durch exogen angebotenes Protoporphyrin IX drastisch verstärkt werden.

Daß die von diesem Pigment absorbierte Lichtenergie vornehmlich zur Bildung von Singulett-Sauerstoff verwendet wird, zeigen folgende Ergebnisse: Die Zugabe von Quenchern dieser energiereichen O_2-Spezies (5 mM Azid oder 5 mM α-Tocopherol) führt zu einer deutlichen Hemmung des Lichteffekts. Dagegen zeigt der Hydroxylradikal-Quencher Mannit - über einen großen Konzentrationsbereich zugegeben - ebenso wie Superoxiddismutase (0 - 15 µg/ml) keine Wirkung.

Dieser energiereiche Singulett-Sauerstoff wird in den Zellen beider Mutanten in verschiedene Moleküle eingebaut. So wurde eine Lipidperoxidation durch Bestimmung des dabei entstehenden Malondialdehyds nachgewiesen. Diese Reaktion verläuft über 6 Stunden linear, ist strikt lichtabhängig, findet in N_2-Atmosphäre nicht statt und ist durch die Quencher des Singulett-Sauerstoff (5 mM Azid oder 25 mM DABCO) hemmbar.

Die Belichtung von Chlorella-Mutanten führt außerdem zu einem oxidativen Abbau von freien Aminosäuren. Davon sind im wesentlichen Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin betroffen. Die Hemmbarkeit dieser Photooxidation durch die Quencher Azid (5 mM) und DABCO (25 mM) zeigt, daß Singulett-Sauerstoff als Intermediärprodukt bei diesem photodynamischen Prozeß beteiligt ist.

Eine Protoporphyrin IX-sensibilisierte Aktivierung von Sauerstoff führt in vitro auch zu einer Oxidation von Cystein. Die Reaktionsprodukte Cystin und Cysteinsäure zeigen, daß Singulett-Sauerstoff mit der Sulfhydrilgruppe von Cystein reagiert. Diese Reaktion ist durch Azid (10 mM) hemmbar.

Daß eine solche, durch photodynamische Prozesse ausgelöste Änderung des Verhältnisses von SH/S-S bei Stoffwechselvorgängen in der Pflanze eine Rolle spielen kann, wurde mit folgenden Versuchen gezeigt: Eine 1-minütige Blaulichtbestrahlung protoporphyrinhaltiger (25 µM) Vesikel der Maiskoleoptile führt zu einer starken Hemmung der intravesikulären Ansäuerung. Eine 10-minütige Inkubation mit GSH (10 mM) vermag diese Hemmung teilweise aufzuheben. Es wird angenommen, daß bei diesem photodynamischen Prozeß die Hemmung auf einer reversiblen Oxidation von SH-Gruppen der Protonenpumpen beruht und Singulett-Sauerstoff als Intermediärprodukt beteiligt ist.

Am Beispiel der Wachstumsregulation und der Induktion der Carotinoidsynthese wird diskutiert, wie photodynamische Effekte wichtige physiologische Prozesse steuern können.

6. Literaturverzeichnis

Batra, P.: Mechanism of light-induced carotenoid synthesis in nonphotosynthetic plants.
In: Giese, A. (Ed.): Photophysiology, Vol VI; 47-76.
Acad. Press, New York - London (1971)

Batra, P., Rilling, H.: On the mechanism of photoinduced carotenoid synthesis: Aspects of the photoinductive reaction.
Arch. Biochem. Biophys. 107, 485 (1964).

Bodannes, R., Chan, P.: Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen.
FEBS Lett. 105, 195 (1979)

Breitbart, H., Malik, Z.: The effects of photoactivated protoporphyrin on reticulocyte membranes, intracellular activities and hemoglobin precipitation.
Photochem. Photobiol. 35, 365 (1982)

Brinkmann, G., Senger, H.: Blue light regulation of chloroplast development in Scenedesmus mutant C-1A'.
In: Senger, H. (Ed.): The blue light syndrome. 526-540.
Springer, Heidelberg-Berlin-New York (1980)

Buege, J., Aust, S.: Microsomal lipid peroxidation.
Meth. Enzymol. 52, 302 (1978)

Buettner, G., Oberley, L.: Superoxide formation by protoporphyrin as seen by spin trapping.
FEBS Lett. 98, 18 (1979).

Burchard, R., Dworkin, M.: Light-induced lysis and carotenogenesis in Myxococcus xanthus.
J. Bacteriol. 91, 535 (1966).

Burchard, R., Hendricks, S.: Action spectrum for carotenogenesis in Myxococcus xanthus.
J. Bacteriol. 97, 1165 (1969)

Chauvet, J.-P., Villain, F., Viovy, R.: Photooxidation of chlorophyll and pheophytin. Quenching of singlet oxygen and influence of the micellar structure.
Photochem. Photobiol. 34, 557 (1981)

Cohen, D., Schiff, J.: Events surrounding the early development of Euglena chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 177, 201 (1976)

Cosgrove, D.: Rapid inhibition of hypocotyl growth by blue light in Sinapis alba L.
Plant Sci. Lett. 25, 305 (1982)

Cox, G., Bobillier, C., Whitten, D.: Photooxidation and singlet oxygen sensitization by protoporphyrin IX and its photooxidation products.
Photochem. Photobiol. 36, 401 (1982)

Dubbelman, T., De Goeij, A., Christianse, K., Van Steveninck, J.: Protoporphyrin-induced photodynamic effects on band 3 protein of human erythrocyte membranes.
Biochem. Biophys. Acta 649, 310 (1981)

Emerson, R., Lewis, C.: The dependence of the quantum yield of Chlorella photosynthesis on wave length of light.
Am. J. Bot. 30, 165 (1943)

Fahrenholtz, S., Doleiden, F., Trozzolo, A., Lamola, A.: On the quenching of singlet oxygen by α-tocopherol.
Photochem. Photobiol. 20, 505 (1974)

Falk, J.: Porphyrins and Metalloporphyrins.
B.B.A. Library Vol. 2.
Amsterdam - London - New York (1964)

Finazzi-Agró, A., Floris, G., Fadda, M., Crifó, C.: Role of oxygen radicals scavenging enzymes in the protoporphyrin induced photohemolysis.
Experientia 35, 1445 (1979)

Foote, C.: Quenching of singlet oxygen.
In: Wasserman, H., Murray, R. (Eds.): Singlet oxygen. 139-171.
Acad. Press, New York - San Francisco - London (1979)

Franssen, J., Cooke, S., Digby, J., Firn, R.: Measurements of differential growth causing phototropic curvature of coleoptiles and hypocotyls.
Z. Pflanzenphysiol. 103, 207 (1981)

Gommers, F., Bakker, J., Wynberg, H.: Dithiophenes as singlet oxygen sensitizers.
Photochem. Photobiol. 35, 615 (1982)

Gorman, A., Rodgers, M.: Singlet molecular oxygen.
Chem. Soc. Rev. 10, 205 (1981)

Gressel, J.: Blue light photoreception.
Photochem. Photobiol. 30, 749 (1979)

Häder, D., Poff, K.: Light-induced accumulation of Dictyostelium discoideum amoebae.
Photochem. Photobiol. 29, 1157 (1979)

Hager, A.: Das differentielle Wachstum bei photo- und geotropischen Krümmungen.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 84, 331 (1971)

Hager, A., Frenzel, R., Laible, D.: ATP-dependent proton transport into vesicles of microsomal membranes of Zea mays coleoptiles.
Z. Naturforsch. 35 c, 783 (1980)

Hager, A., Helmle, M.: Properties of an ATP-fueled Cl^--dependent proton pump localized in membranes of microsomal vesicles from Maize coleoptiles.
Z. Naturforsch. 36 c, 997 (1981)

Hager, A., Meyer-Bertenrath, T.: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden.
Planta (Berl.) 69, 198 (1966)

Hager, A., Schmidt, R.: Auxintransport und Phototropismus I.
Planta (Berl.) 83, 347 (1968a)

Hager, A., Schmidt, R.: Auxintransport und Phototropismus II.
Planta (Berl.) 83, 372 (1968b)

Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates.
FEBS Lett. 92, 321 (1978)

Heath, R., Packer, L.: Photoperoxidation in isolated chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 125, 189 (1968)

Heelis, P.: The photophysical and photochemical properties of flavins (Isoalloxazines).
Chem. Soc. Rev. 11, 15 (1982)

Houba-Herin, N., Calberg-Bacq, C., Piette, J., Van De Vorst, A.: Mechanisms for dye-mediated photodynamic action: Singlet oxygen production, deoxyguanosine oxidation and phage inactivating efficiencies.
Photochem. Photobiol. 36, 297 (1982)

Howes, C., Batra, P.: Mechanisms of photoinduced carotenoid synthesis.
Arch. Biochem. Biophys. 137, 175 (1970)

Ito, T.: Toluidine blue: The mode of photodynamic action in Yeast cells.
Photochem. Photobiol. 25, 47 (1977)

Ito, A., Ito, T.: Enhancing effect of ascorbate on toluidine blue-photosensitization of Yeast cells.
Photochem. Photobiol. 35, 501 (1982)

Jori, G.: The molecular biology of photodynamic action.
In: Prates, R., Sacchi, C. (Eds.): Lasers in photomedicine and photobiology; Proceedings of the Europ. Phys. Soc. 58-66. Berlin (1980)

Jori, G., Reddi, E., Rossi, E., Cozzani, I., Tomio, L., Zorat, P., Pizzi, G., Calzavara, F.: Porphyrin-sensitized photoreactions and their use in cancer phototherapy.
Med. Biol. Environnement 8, 141 (1980)

Kamiya, A., Miyachi, S.: Effects of blue light on respiration and carbon dioxide fixation in colorless Chlorella mutant cells.
Plant Cell Physiol. 15, 927 (1974)

Kandler, O., Schötz, F.: Untersuchungen über die photooxidative Farbzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorella-mutanten und panaschierten Oenotheren.
Z. Naturforsch. B 11, 708 (1956)

Kirk, J., Tilney-Bassett, R.: The plastids: Their chemistry, structure, growth and inheritance.
New York; Elsevier North-Holland. 2nd ed. (1978)

Koch, J., Oberlander, R., Tamas, I., Germain, J., Sherman Ammondson, D.: Evidence of singlet oxygen participation in the chlorophyll-sensitized photooxidation of indolacetic acid.
Plant Physiol. 70, 414 (1982)

Kowallik, W.: Action spectrum for an enhancement of endogenous respiration by light in Chlorella.
Plant Physiol. 42, 672 (1967)

Kowallik, W.: Der Einfluß von Licht auf die Atmung von Chlorella bei gehemmter Photosynthese.
Planta (Berl.) 86, 50 (1969)

Kowallik, W.: Blue light effects on respiration.
Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 51 (1982)

Kowallik, W., Gaffron, H.: Respiration induced by blue light.
Planta (Berl.) 69, 92 (1966)

Kowallik, W., Schätzle, S.: Enhancement of carbohydrate degradation by blue light.
In: Senger, H. (Ed.): The blue light syndrome. 344-360.
Springer; Berlin - Heidelberg - New York (1980)

Kowallik, W., Scheil, I.: Lichtbedingte Veränderungen des ATP-Spiegels einer chlorophyllfreien Chlorella-Mutante.
Planta (Berl.) 131, 105 (1976)

Lamola, A.: Photodegradation of biomembranes.
In: Castellani, A.: Research in photobiology. 53-63.
Plenum Press; New York - London (1976)

Lang-Feulner, J., Rau, W.: Redox dyes as artificial photoreceptors in light-dependent carotenoid synthesis.
Photochem. Photobiol. 21, 179 (1975)

Lechtken, P.: Singulett-Sauerstoff.
Chemie in unserer Zeit 8, 11 (1974)

Nultsch, W., Schuchart, H., Wenderoth, K.: Einfluß von Azid auf die Phototaxis von Anabaena variabilis. Poster 201; Jubiläumstagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Freiburg i. Br., 1982

Pickett, J., French, C.: The action spectrum for blue-light-stimulated oxygen uptake in Chlorella.
Proc. N.A.S. 57, 1587 (1967)

Poff, K., Butler, W.: Spectral characteristics of the photoreceptor pigment of phototaxis in Dictyostelium discoideum.
Photochem. Photobiol. 20, 241 (1974)

Presti, D., Delbrück, M.: Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision.
Plant Cell Environment 1, 81 (1978)

Rau, W.: Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese II. Ersatz der Lichtinduktion durch Mercuribenzoat.
Planta (Berl.) 74, 263 (1967)

Rau, W.: Photoregulation of carotenoid biosynthesis: An example of photomorphogenesis.
In: Czygan, F.-C. (Ed.): Pigments in Plants. 80-103.
Gustav Fischer Verlag; Stuttgart - New York (1980a)

Rau, W.: Blue light-induced carotenoid biosynthesis in microorganisms.
In: Senger, H. (Ed.): The blue light syndrome. 283-298.
Springer; Berlin - Heidelberg - New York (1980b)

Reynolds, E.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208 (1963)

Ruppel, H.-G.: Untersuchungen über die Zusammensetzung von Chlorella bei Synchronisation im Licht-Dunkel-Wechsel.
Flora 152, 113 (1962)

Ruthmann, A.: Methoden der Zellforschung.
Kosmos; Stuttgart (1966)

Senger, H. (Ed.): The blue light syndrome.
Springer; Berlin - Heidelberg - New York (1980)

Senger, H.: The effect of blue light on plants and micro-organisms.
Photochem. Photobiol. 35, 911 (1982)

Smith, K.: Porphyrins and Metalloporphyrins.
Amsterdam - New York - Oxford (1975)

Spurr, A.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res. 26, 31 (1969)

Vargas, M., Mauriño, S., Maldonado, J., Apricio, P.: Photo-inactivation of nitrate reductase sensitized by flavin mono-nucleotide. Evidence for the involvement of singlet oxygen.
Photochem. Photobiol. 36, 223 (1982)

Wasserman, H., Lipshutz, B.: Reactions of singlet oxygen with heterocyclic systems.
In: Wasserman, H., Murray, R. (Eds.): Singlet oxygen. 429-509.
Acad. Press; New York - San Francisco - London (1979)

Youngman, R., Elstner, E.: Oxygen species in paraquat toxicity: The crypto-OH radical.
FEBS Lett. 129, 265 (1981)

7. Abkürzungen

AA	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DTT	1,4.Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
ERL	Epxoy resin of low viscosity
GSH	Glutathion (reduziert)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
PCMB	p-Chloromercuribenzoesäure
PHMB	p-Hydroxymercuribenzoesäure
PP	Protoporphyrin
SHAM	Salicylhydroxaminsäure
TBA	2-Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Lebenslauf

03.02.1954	Geboren in Stuttgart als Sohn des Dr. phil. Dr. med. vet. Dietrich Krauß und seiner Frau Maria, geb. Wall.
1961 - 1965	Grundschule in Stuttgart
1965 - 1973	Eberhard-Ludwigs-Gymnasium Stuttgart
06.06.1973	Abitur
1973 - 1974	Wehrdienst
1974 - 1980	Biologie- und Sportstudium an der Universität Tübingen
1979	Staatsexamen in Sportwissenschaft
1980	Staatsexamen in Biologie
1980	Wissenschaftliche Arbeit am Institut für Biologie I, Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hager mit dem Thema: Lichtinduzierte Sauerstoffaufnahme in einer weißen und gelben Chlorella-Mutante
1980 - 1983	Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie im Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hager über das Thema: Molekularer Mechanismus der blaulichtabhängigen Sauerstoffaufnahme bei einer gelben und einer weißen Chlorella-Mutante
1980 - 1983	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, Bentrup, Bunke, Dobat, Drumm, Engelmann, Engels, Frey, Gabler, Göhner, Gradmann, Grell, Grupe, Hadeler, Hahn, Hager, Jeschke, Kurz, Metzner, Mickoleit, Möhres, Netzel, Oberwinkler, Rähle, Seitz, Seyffert, Schmidt-König, Schwemmle.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353